VIVIANA GALIMBERTI ARRUK

**Avaliação do sistema complemento e produção de
anticorpos de pacientes HIV negativos com
neurocriptococose**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de: Patologia

Orientadora: Dra. Anete Sevciovic
Grumach

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Arruk, Viviana Galimberti

Avaliação do sistema complemento e produção de anticorpos de pacientes HIV negativos com neurocriptococose / Viviana Galimberti Arruk. -- São Paulo, 2011.
a da Universidade de São Paulo.

Programa de Patologia.

Orientadora: Anete Sevciovic Grumach.

Descritores: 1.Meningite criptocócica 2.Proteínas do sistema complemento
3.Resposta de anticorpos 4.Antígenos de fungos 5.Glucoronoxilomanana 6.Via da

A
Deus,
Nossa Senhora de Fátima...

Onde haja cisão, que Ele traga a integração
Onde haja conhecimento, que Ele traga a verdade
Onde haja técnica, que Ele traga sentimento

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Pessoa

Aos meus pais, Guilherme e Anna Maria

Ao meu irmão, Flavio

À minhas avó, Mathilde Helena.

Ao Paulo

Pela dedicação, confiança, amor e incentivos tão marcantes em minha vida.

“Dar o sorriso quando em nós só há trevas
Dar o amor quando o próprio amor foi desenganado
Dar segurança quando estamos sofrendo a pior solidão
Matar a sede dos outros com nosso próprio deserto
Ser chama quando em nós não há fogo.”

Agradecimentos

“Sonho que se sonha só é apenas um sonho, sonho que se sonha junto já começa a ser realidade”

D.Helder Câmara

À Dra. Anete Sevciovic Grumach pelos ensinamentos, pela orientação segura, exemplo de trabalho, competência e muita paciência.

Aos professores da Banca de Qualificação: Dr. Carlos Eduardo Bacchi, Dra. Maria Irma Seixas Duarte e Dr. Jorge Casseb pelas sugestões dadas durante o Exame de Qualificação, incentivo e confiança.

Ao Prof. Dr. Antonio Walter Ferreira pelos ensinamentos científicos e de vida, pela grande amizade, pela “adoção” e carinho, *um exemplo a ser seguido.....*

Ao Prof. Dr. Raymundo Soares de Azevedo Neto pelo apoio em todos os momentos e pela confiança a mim dedicada.

Ao Prof. Dr. Alberto Duarte pela confiança depositada em mim.

Às amigas do “grupo do Complemento” do LIM 56- IMT-SP: Kélem, Katya e Meire pela colaboração, pelo incentivo, pelas conversas, pelas *crises de adolescentes*, enfim, pelo carinho e amizade compartilhados durante esses anos...

Ao Paulo, pelo incentivo e apoio desde o início do projeto, por não me deixar desistir e, principalmente, pela paciência.

Aos amigos e colegas da Faculdade de Saúde da Universidade Metodista de São Paulo, em especial, Prof. Dr. Isaltino M. Conceição e Prof. Dr. Rogério G. Bellot, que sempre me incentivaram a não desistir. Muito Obrigada!!

À Katya pela oportunidade e confiança depositadas em mim. Muito obrigada por tudo.

À Inneke e Régis pela amizade em todos os momentos.

Às orientandas, ex-alunas e principalmente amigas: Angelina Arantes Wagner, Luciana Maria Davanzo, Carolina Cristina Sigarini, pela colaboração em várias etapas do trabalho e acima de tudo pela amizade.

A todo pessoal, bons amigos, do LIM 56 pelo convívio diário e ajuda sempre que precisei.

A todos os meus alunos da Universidade Metodista de São Paulo e Faculdade de Medicina – ABC pelos ensinamentos diários nas salas de aula e corredores.

À Liduvina e ao Thiago, secretários da Pós-Graduação do Programa de Patologia - FMUSP, pela paciência e dedicação em todas as horas.

Aos pacientes e familiares, aos granjeiros da Cidade de Jumirim, interior de São Paulo, MUITO OBRIGADA pela valiosa colaboração, acolhida e experiência de vida. Sem vocês a realização deste estudo não seria possível.

Ao pessoal do Laboratório de Micologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo pela colaboração fundamental na realização desse trabalho.

À FAPESP, pelo apoio financeiro concedido a esse projeto.

A todos que de algum modo me incentivaram e ajudaram na realização do trabalho, minha admiração, respeito e eterna amizade. Muito obrigada

Vocês:

São aqueles que me tornam melhor, pela bondade manifesta.

Que me corrigem, mesmo sem palavras.

Que me reanimam, com sua vida partilhada.

Que me compreendem, quando todos me parecem adversos.

Sumário

<i>I. Introdução.....</i>	1
1. Histórico	2
2. Etiologia e epidemiologia.	4
3. Patogenia	9
4. Manifestações Clínicas	13
5. Sistema Imunológico na Criptococose	17
A- Macrófagos alveolares	18
B- Células inflamatórias	19
C- Sistema Complemento	19
D- A resposta adquirida	26
6. Justificativa.....	31
 <i>II. Objetivos.....</i>	 32
Objetivo Geral.....	33
Objetivos específicos.....	33
 <i>III. Métodos</i>	 34
1. População estudada	35
2. Quantificação do título do antígeno GXM circulante	39
3. Avaliação do Sistema Complemento	40
3.1- Ensaio hemolítico para dosagem da via clássica (CH 50).....	40

3.2- Ensaio hemolítico para dosagem da via alternativa (AP 50)	41
3.3- Dosagem da proteína MBL	43
4. Avaliação da produção de anticorpos específicos anti-criptococos.....	44
4.1. Obtenção dos antígenos de <i>Cryptococcus</i> sp: GXM e antígeno somático	44
4.1.1. Antígeno GXM de <i>Cryptococcus</i> sp.....	44
4.1.2. Antígeno somático de <i>Cryptococcus</i> sp.....	45
4.2. Detecção de anticorpos IgG anti-GXM e anti-antígeno protéico bruto (AgS) padronizado “ <i>in house</i> ”	46
4.3. Detecção de anticorpos IgA anti-GXM e anti-AgS, padronizado “ <i>in house</i> ”	47
5. Avaliação estatística	48
IV. Resultados.....	49
1. População estudada	50
2. Quantificação do título do antígeno capsular GXM circulante	50
3. Avaliação do sistema complemento	53
3.1. Ensaio hemolítico para dosagem da via clássica (CH 50).....	53
3.2. Ensaio hemolítico para dosagem da via alternativa.....	55
3.3. Dosagem da proteína MBL.....	57
4. Avaliação da produção de anticorpos específicos anti-criptococos.....	60
4.1. Detecção de anticorpos IgG anti-GXM e anti-antígeno protéico bruto (AgS) padronizado “ <i>in house</i> ”	60
4.2. Detecção de anticorpos IgA anti-GXM e anti-antígeno protéico bruto (AgS) padronizado “ <i>in house</i> ”	64

5. Correlação entre a quantidade de MBL e os títulos de GXM nas amostras séricas dos três grupos.....	67
6. Correlação entre a resposta de anticorpos e os títulos de GXM nas amostras séricas dos três grupos	68
7. Correlação entre a resposta de anticorpos e concentração de MBL nas amostras séricas dos três grupos.....	69
<i>V. Discussão.....</i>	71
<i>VI. Conclusões</i>	85
<i>VII. Anexos.....</i>	88
Anexo A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	89
Anexo B: Questionário.....	90
<i>VIII. Referências Bibliográficas.....</i>	92

Lista de Tabelas

Tabela 1: Características das principais variedades do <i>Cryptococcus</i> sp.....	8
Tabela 2: Fatores de virulência do <i>Cryptococcus</i> sp.....	13
Tabela 3: Características epidemiológicas e título de GXM circulante nos grupos 1 (pacientes com neurocriptococose ativa), grupo 2 (granjeiros saudáveis e com alta exposição ao fungo) e grupo 3 (indivíduos com baixa exposição ao fungo).....	51
Tabela 4: Distribuição das amostras séricas nos diferentes grupos por faixas de concentração de MBL.....	59
Tabela 5: Distribuição da frequência das amostras séricas nos diferentes grupos por faixas de DO de anticorpos anti-GXM.....	62
Tabela 6: Comparação entre os títulos de GXM circulante e os valores de MBL (ng/mL) em amostras séricas no grupo 1 (neurocriptococose ativa), grupo 2 (indivíduos com alta exposição ao fungo) e grupo 3 (indivíduos saudáveis com presumida exposição baixa ao fungo).....	68
Tabela 7: Comparação entre os títulos de GXM circulante e a produção de anticorpos IgG específicos anti-GXM em amostras séricas no grupo 1 (neurocriptococose ativa), grupo 2 (indivíduos com alta exposição ao fungo) e grupo 3 (indivíduos saudáveis com presumida exposição baixa ao fungo).....	69

Tabela 8: Comparação entre as concentrações de MBL e DO de anticorpos IgG anti-GXM nos grupos 1 (neurocriptococose ativa), grupo 2 (indivíduos com alta exposição ao fungo) e grupo 3 (indivíduos saudáveis com presumida exposição baixa ao fungo).....

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema do Reino <i>Fungi</i> , com ênfase do filo <i>Basidiomycotina</i>	5
Figura 2: Resumo dos principais componentes e ações efectoras do Sistema Complemento.....	23
Figura 3: Mapa do Estado de São Paulo	37
Figura 4: Cidade de Jumirim, localizada no Estado de São Paulo, a 164 km da cidade de São Paulo, entre as cidades de Botucatu e Sorocaba.....	37
Figura 5: Distribuição por sexo e título de GXM circulante nos grupos 1 (pacientes com neurocriptococose ativa) e grupo 2 (granjeiros saudáveis e com alta exposição ao fungo)	52
Figura 6: Ativação da via clássica (CH 50) em amostras dos indivíduos do grupo 1(pacientes com neurocriptococose); grupo 2 (indivíduos com alta exposição ao fungo) e grupo 3 (indivíduos saudáveis com presumida exposição ao fungo) (UI/mL).....	54
Figura 7: Ativação da via alternativa (AP 50) em amostras dos indivíduos do grupo 1(neurocriptococose ativa); grupo 2 (indivíduos com alta exposição ao fungo) e grupo 3 (indivíduos saudáveis com presumível exposição ao fungo) (UI/mL).....	56

Figura 8: Dosagem da proteína MBL em amostras séricas dos indivíduos do grupo 1 (neurocriptococose ativa); grupo 2 (indivíduos com alta exposição ao fungo) e grupo 3 (indivíduos com presumida exposição ao fungo) em ng/mL.....	58
--	----

Figura 9: IgG anti-GXM expresso em densidade óptica nos três grupos: grupo 1 (neurocriptococose ativa); grupo 2 (indivíduos com alta exposição ao fungo) e grupo 3 (indivíduos saudáveis com presumida exposição baixa ao fungo)	61
---	----

Figura 10: IgG anti-AgS, nos três grupos, expresso em densidade óptica: grupo 1 (neurocriptococose ativa); grupo 2 (indivíduos com alta exposição ao fungo) e grupo 3 (indivíduos saudáveis com presumida exposição baixa ao fungo)	63
--	----

Figura 11: IgA anti-GXM, nos três grupos, expresso em densidade óptica: grupo 1 (neurocriptococose ativa); grupo 2 (indivíduos com alta exposição ao fungo) e grupo 3 (indivíduos saudáveis com presumida exposição baixa ao fungo)	65
--	----

Figura 12: IgA anti-AgS, nos três grupos, expresso em densidade óptica: grupo 1 (neurocriptococose ativa); grupo 2 (indivíduos com alta exposição ao fungo) e grupo 3 (indivíduos saudáveis com presumida exposição baixa ao fungo)	66
--	----

Lista de abreviaturas

- ✓ **AcMo:** anticorpo monoclonal
- ✓ **AcPo:** anticorpo policlonal
- ✓ **ADCC:** citotoxicidade celular dependente de anticorpo
- ✓ **AgS:** antígenos protéicos brutos da parede celular do *Cryptococcus* sp
- ✓ **AP 50:** ensaio hemolítico da via alternativa- 50%
- ✓ **APC:** célula apresentadora de antígenos
- ✓ ***C.gattii:*** *Cryptococcus gattii*
- ✓ ***C.neoformans:*** *Cryptococcus neoformans*
- ✓ **C1:** molécula inicializadora da cascata do complemento pela via Clássica
- ✓ **C1q:** fragmento bioativo produzido após a degradação enzimática da proteína C1
- ✓ **C2:** molécula do complemento via clássica
- ✓ **C3:** molécula iniciadora da cascata do complemento via alternativa
- ✓ **C3a:** anafilotoxina produzida após a degradação enzimática de C3
- ✓ **C3b:** fragmento bioativo produzido após degradação enzimática de C3
- ✓ **C4:** molécula iniciadora da cascata do complemento via das lectinas
- ✓ **C4a:** anafilotoxina produzida após a degradação enzimática de C4
- ✓ **C5:** molécula do sistema complemento
- ✓ **C5a:** anafilotoxina produzida após a degradação enzimática de C5
- ✓ **C9:** molécula do complemento via terminal
- ✓ **CD:** *cluster differentiation*

- ✓ **CH 50:** ensaio hemolítico da via clássica- 50%
- ✓ **CR3:** receptor de complemento 3
- ✓ **DO:** densidade óptica
- ✓ **EDTA:** ácido etilenodiaminotetracético
- ✓ **ELISA:** ensaio imunoenzimático
- ✓ **Fc:** fator de cristalização ou constante do anticorpo
- ✓ **FMSF:** fenilmetilsulfonilfluoreto
- ✓ **GALXM:** galactoxilomanana
- ✓ **GSL:** glicofingolipídeos
- ✓ **GVBS-MG:** tampão Veronal suplementado por gelatina e magnésio
- ✓ **GXM:** glucuronoxilomanana
- ✓ **GXM-TT:** glucuronoxilomanana conjugada ao toxóide tetânico
- ✓ **H₂O:** água
- ✓ **H₂O₂:** água oxigenada
- ✓ **H₂SO₄:** ácido sulfúrico
- ✓ **HC-FMUSP:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo
- ✓ **HIV:** *vírus da imunodeficiência humana*
- ✓ **IFN-γ:** interferon gama
- ✓ **IgA:** Imunoglobulina A
- ✓ **IgG 1:** imunoglobulina G de sub-classe 1
- ✓ **IgG 2:** imunoglobulina G de sub-classe 2
- ✓ **IgG 3:** imunoglobulina G de sub-classe 3
- ✓ **IgG:** Imunoglobulina G

- ✓ **IgM:** Imunoglobulina M
- ✓ **IIER:** Instituto de Infectologia Emílio Ribas
- ✓ **IL:** interleucina
- ✓ **IMT:** Instituto de Medicina Tropical
- ✓ **kDa:** quilo Dalton
- ✓ **LCR:** líquido cefalorraquidiano
- ✓ **LD:** leite em pó desnatado
- ✓ **LT:** linfócito T
- ✓ **LTCD4⁺:** linfócito T sub-população auxiliadora
- ✓ **LTCD8⁺:** linfócito T sub-população citotóxica
- ✓ **MAC:** complexo de ataque a membrana
- ✓ **MASP-1/2:** proteína surfactante de membrana 1/2
- ✓ **MBL:** proteína ligante de manose
- ✓ **MP:** manoproteínas
- ✓ **NK:** células matadoras naturais
- ✓ **PAMP:** padrão molecular de microorganismo
- ✓ **PBS:** tampão salina fosfato
- ✓ **PBS-T20:** tampão fosfato e salina acrescido de Tween 20®
- ✓ **pH:** índice hidrogeniônico
- ✓ **PMN:** células polimorfonucleares
- ✓ **PSCN:** polissacarídeos do *Cryptococcus* sp
- ✓ **SDRA:** Síndrome do desconforto respiratório do adulto
- ✓ **SH:** sistema hemolítico
- ✓ **SNC:** Sistema Nervoso Central

- ✓ **sp:** espécies
- ✓ **Th1:** linfócito T auxiliar tipo 1
- ✓ **TMB:** solução cromogênica- tetrametilbenzidina.
- ✓ **TNF- α :** Fator de necrose tumoral α
- ✓ **var:** variedade
- ✓ **VBS:** tampão Veronal

RESUMO

Arruk, VG. *Avaliação do sistema complemento e produção de anticorpos de pacientes HIV negativos com neurocriptococose*. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2011

Cryptococcus sp é um fungo saprófita, cosmopolita, que causa micose sistêmica, geralmente, subaguda ou crônica, conhecida, sobretudo, por sua localização meníngea, após aquisição da infecção por via respiratória. Embora seja ubíquo, a criptococose ocorre predominantemente em indivíduos imunodeficientes e podendo ocorrer, também, em indivíduos imunocompetentes. Os estudos experimentais e em humanos avaliando a ativação do sistema complemento e a produção de anticorpos específicos mostram que a resposta inata e de anticorpos são importantes para a delimitação do processo infeccioso por *Cryptococcus sp*, como também, a administração de anticorpos monoclonais podem induzir uma resposta eficaz na disseminação da doença. O sistema complemento contribui para a defesa do organismo contra o *Cryptococcus sp* de diferentes maneiras: secretando opsoninas e fatores quimiotáticos e colaborando com a ação dos anticorpos específicos, aumentando a interação entre a imunidade inata e adquirida. Os anticorpos anti-glicuroxilomanana (GXM) possuem numerosas atividades biológicas: a) opsonização para fagocitose, b) ativação da via clássica do complemento resultando na deposição precoce de fragmentos de C3 no fungo, c) supressão do excesso de acúmulo de C3 pela via alternativa; d) facilitação do clareamento do GXM do soro *in vivo*, resultando no maior acúmulo de GXM nos tecidos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear; e) proteção em modelos murinos da criptococose e f) facilitação de vários aspectos da imunidade celular ao *Cryptococcus sp*. O objetivo desse estudo foi avaliar a resposta humoral ao GXM e às proteínas da parede celular (Ag S) avaliando a atividade do sistema complemento como também a produção de anticorpos específicos em amostras séricas de adultos com e sem neurocriptococose. Foram coletadas 106 amostras de soro e divididas em 3 grupos: grupo 1- 21 indivíduos com neurocriptococose e baixa exposição a levedura, grupo 2- foi composto por 23 indivíduos saudáveis com alta exposição ao fungo e HIV negativos, granjeiros da cidade de Jumarim localizada a 164 km de São Paulo, na região de Sorocaba e, o grupo 3- 60 indivíduos saudáveis, HIV negativos e com baixa

exposição ao *Cryptococcus* sp. Dois pacientes foram excluídos do estudo por apresentarem tumores (timoma e câncer de pulmão). O sistema complemento foi avaliado por ensaio hemolítico (CH 50 e AP 50) e, a dosagem da proteína ligadora de manose (MBL) foi feita por ELISA. Os valores de CH 50 estiveram dentro da normalidade em 17/21, 13/23, 59/60 indivíduos dos grupos 1, 2 e 3 respectivamente. A média dos valores de CH 50 foi diferente significativamente entre os três grupos ($P < 0,0001$). O grupo 2 mostrou níveis reduzidos significantes em comparação aos dois outros grupos. Os valores de AP 50 estiveram dentro da normalidade em 11/21; 21/23 e 60/60 indivíduos dos grupos 1, 2 e 3 respectivamente. Houve diferença nos valores de AP 50 ($P = 0,0005$) e apenas um paciente do grupo 1 apresentou valores indetectáveis desta via. Houve diferença significativa na dosagem de MBL entre os três grupos ($P = 0,0277$). Anticorpos IgG anti-GXM foram quantificados por ELISA e expressos por densidade óptica (DO). IgG anti GXM foi detectado em todos os grupos com diferença significativa entre eles ($P = 0,0127$). As médias de IgG anti-GXM (DO) foram: 1.191 (0,49 a 1.217) no grupo 1, 1.572 (0,815 a 2.479) no grupo 2 e 0,965 (0,321 a 1.295) no grupo 3. Dois indivíduos assintomáticos do grupo 2 tiveram títulos de GXM detectáveis (1/256 e 1/32). Quatro pacientes com neurocriptococose faleceram (19%) e seus resultados mostravam: CH 50 normal, 2/4 tinham valores de AP 50 baixo (12 UI/mL) e indetectável; 3/4 tinham altos níveis de MBL e apenas um tinha baixa DO de IgG anti-GXM. Baseado em nosso estudo, podemos concluir que a resposta humoral (sistema complemento e anticorpos) não é suficiente para explicar a susceptibilidade a neurocriptococose, porém a alta e constante exposição ao *Cryptococcus* sp pode prevenir o desenvolvimento de doença, ou seja, a constante e intensa exposição ao fungo induz a produção de anticorpos que previnem a doença clínica mas não a infecção. Por outro lado fatores genéticos que determinam as concentrações de MBL podem influenciar na susceptibilidade a neurocriptococose. Os anticorpos contribuem para o clearance de GXM, entretanto as concentrações séricas não se correlacionam com resistência à doença.

Descritores: *meningite criptocócica, proteínas do sistema complemento, resposta de anticorpos, antígenos de fungos, glucuronoxilomanana, via da lectina ligante da manose do complemento, ELISA.*

ABSTRACT

Arruk, VG. *Antibody response to Cryptococcus sp and complement system activation in HIV negative patients with neurocryptococcosis*. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2011

Cryptococcus sp is a fungal pathogen with a worldwide distribution. Although it is ubiquitous in the environment, cryptococcal disease occurs predominantly in immunocompromised hosts and can also occur in apparently immunocompetent individuals. The innate immunity is of special relevance for the antifungal reaction, as it allows an immediate reaction and recognizes a broad variety of fungal pathogens. The host immune response is a major determinant of the outcome of cryptococcal infection; however, the antibodies response is poorly understood. In addition, most of the studies are experimental and there is restricted knowledge concerning the human immune response. Complement system has soluble factors, restrictive regulator proteins and cellular receptors involved in defense mechanism. Glucuroxylomannan (GXM) monoclonal antibodies (MAbs) have numerous biological activities: a) opsonization for phagocytosis, b) activation of the classical complement pathway leading to early deposition of C3 fragments on the yeast, c) suppression overall accumulation of C3 via the alternative pathway; d) clearance facilitation of GXM from serum *in vivo*, leading to increased accumulation of GXM in tissues rich in mononuclear phagocyte system; e) protection in murine models of cryptococcosis and f) facilitation of various aspects of cellular immunity to *Cryptococcus* sp. The goal of our study was to evaluate if the antibody response to GXM and cell wall proteins regarding specific antibodies as well as complement system in sera of immunocompetent adults with and without neurocryptococcosis. The aim of our research was to evaluate classical and alternative complement system pathway, to quantify mannose-binding lectin (MBL) as well antibody response to GXM and cell wall proteins (AgS) regarding specific antibodies in sera of immunocompetent adults with and without neurocryptococcosis. One hundred and six samples were collected and classified in 3 groups: group 1- 21 individuals with neurocryptococcosis and low exposure to the yeast; group 2- was composed by 23 healthy individuals, chicken farmings from Jurumirim, a town 164 km to São Paulo,

and with high exposure to *Cryptococcus spp* and HIV negative. The third group included 60 healthy HIV negative individuals with presumed low exposure to *Cryptococcus*. Two patients were excluded by report of previous malignancies (timoma and pulmonary cancer). The complement system was evaluated by hemolytic assay and ELISA to MBL. CH 50 and AP 50 values were within the normal range in 17/21; 13/23; 59/60 patients in groups 1, 2 and 3 respectively. Mean CH 50 values were significantly different among the three groups ($P < 0,0001$). Group 2 showed significantly reduced levels in comparison with groups 1 and 3. AP 50 values were within the normal range in 11/21; 21/23; 60/60 patients in groups 1, 2 and 3 respectively. There was difference in the AP 50 values ($P=0,0005$) and one no activation of this pathway in group 1. There was significant difference in MBL among the groups ($P = 0,0277$). GXM antibodies IgG was measured by ELISA and expressed as optical density (OD). GXM- IgG was detected in all the groups with significant difference among them ($P = 0,0127$). The means of IgG anti-GXM (OD) were: 1.191 (range 0,49 to 1.217) in group 1, 1.572 (range 0,815 to 2.479) in group 2 and 0,965 (range 0,321 to 1.295) in the group 3. Two of the group 2 individuals had low GXM titers (1/256 and 1/32) and no symptoms. Four patients (4/21; 19%) with neurocryptococcosis died and the results showed: normal classical pathway activation, 2/4 had low (12 UI/mL) or undetectable alternative pathway values ; 3/4 had high MBL concentrations and only one had low OD for IgG anti-GXM. In conclusion, our results suggest that constant and high exposure to *Cryptococcus sp* can prevent the development of cryptococcosis, i.e. constant and intensive fungal exposition induces protective antibodies to clinical disease but not to the infection. In the other side, genetic factors which determine MBL concentrations could influence the susceptibility to neurocryptococcosis. The antibodies contribute to GXM clearance, however, the concentrations did not correlate with the resistance to the disease.

Descriptors: meningitides cryptococcal; complement system proteins, antibody response, antigens fungal; glucuronoxylomanann, complement pathway mannose-binding lectin, enzyme-linked immunosorbent assay.

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é MUITO para ser insignificante”

Charles Chaplin.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Investigação Médica- LIM 56 HC- FMUSP localizado no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - USP, em colaboração com o Instituto de Infectologia Emílio Ribas - IIER. Apoio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo nº 02/00024-2.

I. INTRODUÇÃO

1. Histórico

Otto Busse e Abraham Buschke, em 1894, relataram a presença de um microorganismo patogênico em lesão óssea de uma mulher com aproximadamente 31 anos de idade (Knoke; Schwesinger, 1994). O patógeno foi descrito por Otto Busse como um microorganismo de corpúsculos redondos que em cultura lembrava um blastomiceto e, portanto, denominou-o *Saccharomyces hominis* e a infecção *saccharomycosis hominis*. Por sua vez, Abraham Buschke, responsável pela paciente, afirmou que o patógeno classificava-se como um *coccidium* (Knoke; Schwesinger, 1994). Na Itália, foi isolada, no mesmo ano, por Sanfelice, uma levedura encapsulada que fermentava suco de pêssago e, em 1895, demonstrou-se que a levedura era patogênica aos animais de laboratório (Casadevall; Perfect, 1998). A levedura recebeu o nome de *Saccharomyces neoformans*, devido à sua capacidade de produzir lesões semelhantes a tumores em animais de laboratório (Drouhet, 1997). Surgiram diferentes denominações para o mesmo microorganismo, o que retardou, por muito tempo, o progresso na pesquisa do *Cryptococcus neoformans* (Casadevall; Perfect, 1998).

O segundo caso de doença por este agente foi relatado por Curtis, na França, que demonstrou a presença de leveduras em lesão de quadril, em 1896, e o patógeno foi denominado *Saccharomyces subcutaneous tumefaciens* (Drouhet, 1997).

Assim, durante todo o século XIX, vários pesquisadores, em todo o mundo, relataram a existência de uma levedura que apresentava diferentes denominações, porém, semelhança nas infecções e, descreveram que o patógeno era um microorganismo encontrado em lesões humanas e em mamíferos, capaz de provocar

doença, que não precisava parasitar outro ser no meio ambiente e, *in vitro*, era capaz de infectar e provocar doença em cobaias (Casadevall; Perfect, 1998).

Em 1901, Vüillemin verificou que o microorganismo não apresentava ascósporos característicos do gênero e denominou-o de *Cryptococcus hominis* (Sidrim, 1999). Anos mais tarde, o microorganismo passou a ser chamado *Cryptococcus neoformans* e Freeman sugeriu que a criptococose havia sido descrita pela primeira vez por Zenker, em 1861, que relatou detalhes clínicos e patológicos de meningite criptococócica, porém o crédito pela descoberta do microorganismo foi dado a Otto Busse e Abraham Buschke que forneceram detalhes clínicos, patológicos e morfológicos do hospedeiro e do patógeno (Knoke; Schwesinger, 1994 e Casadevall; Perfect, 1998).

As infecções pelo *C.neoformans* foram relatadas durante o século XX, em diferentes órgãos, incluindo cérebro, pulmão e pele. Em 1908, Brewer e Wood descreveram um caso de criptococose, localizado na medula óssea, com sinais clínicos raros: a lesão lembrava uma lesão tumoral que sugeria ter sido iniciada por um grande granuloma de eosinófilos e o paciente recuperou-se após a retirada cirúrgica da lesão. Em cultura, o patógeno mostrou ser uma levedura e a doença recebeu o nome de blastomicose (Casadevall; Perfect, 1998).

Em 1912, Rusk e Farnell descreveram mais dois casos de infecção no Sistema Nervoso Central (SNC) e os denominou de oidiomicose. Os autores forneceram detalhes da etiologia da infecção como “massas gelatinosas” nos pulmões, relatando que a reação tecidual era distinta da reação de tuberculose, pois, apresentava um processo granulomatoso crônico (Casadevall; Perfect, 1998).

Nesses termos, a criptococose (torulose, blastomicose européia, doença de Busse-Buschke) é uma micose de natureza sistêmica de porta de entrada inalatória causada por fungos do complexo *Cryptococcus neoformans*, com duas espécies: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (Moretti et al., 2008).

2. Etiologia e Epidemiologia

O reino Fungi está dividido em dois grandes grupos: o grupo *Myxomycota* (constituído de fungos inferiores, sem parede celular e não patogênico ao homem e aos animais) e o grupo *Eumycota* (constituído por fungos verdadeiros que apresentam parede celular e são patogênicos ao homem e animais). O grupo *Eumycota* é subdividido em cinco grandes filos: *Zigomycotina*, *Ascomycotina*, *Deuteromycotina*, *Mastigomycotina* e ***Basidiomycotina*** (figura 1) (Sidrim, 1999).

Cryptococcus sp pertence ao filo *Basidiomycotina*, classe *Blastomycetes*, família *Cryptococcaceae*, gênero *Cryptococcus* (Casadevall; Perfect, 1998; Brummer; Stevens, 1999 e Sidrim, 1999)

Figural1: Esquema do Reino *Fungi*, com ênfase do Filo *Basidiomycotina*.

Cryptococcus sp é um fungo saprófita, cosmopolita, que causa micose sistêmica, geralmente, subaguda ou crônica, conhecida, sobretudo, por sua localização meníngea, após aquisição da infecção por via respiratória (Sidrim, 1999 e Moretti et al., 2008). As leveduras são, habitualmente, encontradas nos humanos e em outros mamíferos como estruturas esféricas ou globosas encapsuladas com material mucopolissacarídico (manose, xilose, ácido glicurônico e glucanas) o que facilita sua capacidade invasiva e patogênica (Lacaz et al., 1984; Batista; Silva, 1991 e Schop, 2007).

O fungo apresenta uma fase sexuada, que ocorre após conjugação de duas cepas compatíveis, formando um pseudomicélio que origina basídios e basidiósporos de cuja germinação, por sua vez, pode originar células leveduriformes (Batista; Silva, 1991; Crissey et al., 1995; Brummer; Stevens, 1999 e Schop, 2007). As células

leveduriformes apresentam reprodução assexuada através de brotamento único ou duplo (Batista; Silva, 1991 e Schop, 2007) denominados blastoconídeos ou gêmulas.

Atualmente, dois termos são utilizados para identificar o patógeno: *Cryptococcus neoformans* para relatar a forma assexuada comumente encontrada na clínica e *Filobasidiella neoformans* para relatar a forma apenas encontrada em laboratório (Kwon-Chung; Bennett, 1992; Sidrim, 1999 e Schop, 2007). O fungo pode ser encontrado em diferentes tipos de solo, tecidos, secreções e excreções de animais e do homem.

Embora o gênero *Cryptococcus* possua 19 espécies diferentes, apenas a espécie *neoformans* é patogênica ao homem (Lacaz et al., 1991; Mitchell, 1998; Sidrim, 1999; Bogaerts et al., 1999; Harrison, 2000 e Zaragoza et al., 2009). Com base nos antígenos polissacarídicos presentes na cápsula e dependendo de sua reatividade com diferentes anti-soros de coelhos, cinco diferentes sorotipos (A, B, C, D e AD) foram definidos para classificar as cepas de *C.neoformans* (Zaragoza et al., 2009). Alguns desses sorotipos classificados incluem *C.neoformans* var. *grubii* (sorotipo A), *C.neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C) e *C.neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D e AD) (Schop, 2007 e Zaragoza et al., 2009). Através de análises genéticas e biológicas da estrutura dos diferentes sorotipos, a variedade *gatti* foi elevada à espécie (Zaragoza et al., 2009).

A espécie *neoformans* é a mais comum, com distribuição urbana e universal, inclusive no Brasil e está associada com o habitat de pássaros, excretas secas, ricas em fontes de nitrogênio, como uréia e creatinina. Condições favoráveis ao crescimento do fungo formam micro focos, notadamente em centros urbanos e relacionados a pombos. O ambiente domiciliar, particularmente na poeira doméstica,

pode apresentar positividade. Fontes ambientais de *Cryptococcus neoformans* foram progressivamente identificadas em árvores em diferentes partes do Brasil, como Rio de Janeiro (RJ), Teresina (PI), Boa Vista e Ilha de Maracá (RR), no interior do Amazonas e na cidade de São Paulo (SP) (Moretti et al., 2008). Em pacientes com AIDS, esta espécie é responsável por 10 a 15% das infecções oportunistas devido ao comprometimento da imunidade celular, estando associada a infecções em imunodeprimidos (Batista; Silva, 1991; Lacaz et al., 1991 e Mitchell et al., 1995).

Cryptococcus gattii prevalece em regiões tropicais ou subtropicais associados à debris de *Eucalyptus camaldulensis* e espécies relacionadas (Ellis; Pfeiffer, 1990; Lacaz et al., 1991; Batista; Silva, 1991 e Mitchell et al., 1995), mas áreas de clima temperado e frio devem ser incluídas em sua distribuição. Atualmente, sabe-se que eucaliptos não representam habitat natural específico nem associação específica com *Cryptococcus gattii*, observando-se diferentes padrões geográficos de ocorrência fungo-árvore-madeira em decomposição (Moretti et al., 2008).

As principais regiões da criptococose *gattii* são Austrália, sudeste da Ásia, África Central e sul da Califórnia e é relatada pela maior incidência de infecção em hospedeiros imunocompetentes (Batista; Silva, 1991; Lacaz et al., 1991; Mitchell et al., 1995; Núñez et al., 1999 e Harrison, 2000). Também ocorre na América Latina (Peru, Colômbia, Argentina, Venezuela, Brasil, México, Nova Guiné) e em algumas regiões dos Estados Unidos. No Brasil, estudos clínico-epidemiológicos mostram a importância da neurocriptococose *gattii* em adultos jovens de ambos os sexos e crianças nas regiões Norte e Nordeste, com letalidade de 35 a 40% (Moretti et al., 2008).

Martinez et al. (1996) avaliaram a prevalência das duas espécies (*neoformans* e *gattii*) em 20 pacientes com meningite criptocócica dos quais, 12 eram HIV positivos e 8 HIV negativos. Os autores não observaram diferença estatística na prevalência das duas espécies, porém, notaram que a espécie *gattii* estava mais frequentemente relacionada à infecção em imunocompetentes, nos quais, os sintomas costumam ser mais graves do que os observados em pacientes imunodeprimidos (tabela 1).

Tabela 1- Características das principais variedades do *Cryptococcus sp*

Características	<i>gattii</i>	<i>neoformans</i> e <i>grubii</i>
Sorotipo	B e C	A, D e AD
Distribuição	Regiões tropicais e sub-tropicais	urbana e mundial
Paciente principalmente	Imunocompetente	Imunodeprimido
Capacidade Quimiotática do Ag	+	++
Resistência ao Itraconazol, Anfotericina e Fluconazol	++	+
Prevalência no Brasil	Maranhão e Piauí	Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul

Nos casos de AIDS, a criptococose é considerada a terceira ou quarta infecção oportunista em frequência e causa importante de morte (Batista; Silva, 1991); 6 a 10 % destes pacientes podem desenvolver meningite criptocócica e, em aproximadamente 40%, a doença será a primeira infecção (Powderly, 1993). A criptococose ocorre com maior frequência no sexo masculino (Duppont et al, 1992; Mitchell et al., 1995). Fernandes et al. (2000), verificaram que este predomínio ocorreu em 78% dos casos de criptococose. No Brasil, a criptococose ocorre como

primeira manifestação oportunista em cerca de 4,4% dos casos de AIDS. A criptococose *neoformans* associada à AIDS predomina nas regiões Sul Sudeste e Centro-Oeste do Brasil (Moretti et al., 2008).

3. Patogenia

Diversos trabalhos relatam fatores essenciais para a permanência do *Cryptococcus* sp no organismo: **a virulência do fungo**, especialmente devido a sua cápsula de mucopolissacarídeos com propriedades anti-fagocitárias e a grande produção de lacase e manitol e, a **resposta imunológica do hospedeiro** (Kozel; Gotschlich, 1982; Chang; Kwon-Chung, 1998; Harrison, 2000).

Cryptococcus sp possui uma cápsula de polissacarídeo que inibe a fagocitose e interfere na apresentação de antígenos e, portanto, na linfoproliferação devido a internalização reduzida das leveduras por células fagocíticas (Vecchiarelli et al., 1998). Os genes CAP 59, CAP 60, CAP 64 e CAP 10 são os responsáveis pela produção da cápsula da levedura, bem como, pelas suas propriedades patogênicas (Chang, Kwon-Chung, 1998; Harrison, 2000).

A habilidade do *Cryptococcus* sp de escapar da resposta imune e causar doença está associada com a produção e secreção destes polissacarídeos capsulares, entre eles, os antígenos: **glucuronoxilomanana (GXM)**, principal componente da cápsula da levedura (Dong; Murphy, 1997; Zaragoza et al., 2009), galactoxilomanana (GalXM) e uma menor proporção de manoproteínas (MP) (Rodrigues et al., 2000 e

Zaragoza et al., 2009). A cápsula tem propriedades imunossupressoras e antifagocíticas que quase certamente contribuem para a evasão fúngica da ação imunológica (Dong; Murphy, 1997; Vecchiarelli et al., 2000; Pietrella, 2003; Schop, 2007 e Zaragoza et al., 2009). Acredita-se que o GXM contribui para a virulência interferindo com a resposta imunológica efetiva (Vecchiarelli et al., 2000; Brandt et al., 2003; Pietrella et al., 2003 e Schop, 2007). Há evidência que o GXM suprime tanto a resposta humoral como a celular e estudos extensos investigaram suas características antigênicas na facilitação dos fatores imunes humorais (Vecchiarelli et al., 1998 e MacGill et al., 2001).

A presença de polissacarídeos (polímeros de α 1,3 manana com cadeias laterais de xilose e ácido glicurônico) envolvendo a célula fúngica encobre opsoninas protéicas situadas na parede e impede a interação do fungo com o receptor do macrófago (Kozel, Gotschlich, 1982; Schop, 2007 e Zaragoza et al., 2009). Outro efeito da cápsula seria a migração insuficiente de células inflamatórias para o foco da infecção (Dong; Murphy, 1997; Schop, 2007 e Zaragoza et al., 2009).

O GXM do *Cryptococcus* sp possui o ácido xilose:mannose:glicurônico. O esqueleto consiste de uma manana ligada linearmente e substituída nas posições 2-O por resíduos únicos de ácido glicurônico ou xilose (Cherniak et al., 1980 e Zaragoza et al., 2009). O GXM é uma (1 $\rightarrow$ 3) α -D-manopirranana linear com substituições únicas de β -D- xilopiranosil e ácido β -D- glucopiranosil-urônico. A estrutura de manose é também variavelmente O acetilada em C-6. O substituto O-acetil é um epítipo principal no reconhecimento do GXM por anticorpos policlonais (AcPo) e monoclonais (AcMo) (Brandt et al., 2003; Zaragoza et al., 2009). O GXM está presente nos 5 sorotipos A, B, C, D e A/D. O grau de substituição da xilose e de O-

acetilação são os determinantes principais da estrutura do GXM de cada sorotipo (Brandt et al, 2003; Lin, Heitman, 2006 e Zaragoza et al., 2009).

A cápsula também pode causar efeitos deletérios nas células imunes do hospedeiro devido a uma molécula de adesão da família das integrinas, presente nas células polimorfonucleares (PMN), ser a principal molécula alvo do GXM. Altos títulos de GXM são comumente encontrados em fluidos corpóreos de pacientes com AIDS e criptococose. A direta interação de GXM com PMN foi demonstrada como regulador da expressão do receptor de TNF podendo impedir o acúmulo de neutrófilos no tecido infectado (Vecchiarelli et al., 1998).

Lipovsky, et al. (1998), demonstraram que existe uma correlação inversamente proporcional entre o título de GXM e a contagem de células no líquido cefalorraquidiano (LCR) na meningite criptocócica.

O GXM impede a fagocitose, inibe o recrutamento de células inflamatórias, inibe o aumento de expressão de moléculas co-estimulatórias, suprime a hipersensibilidade do tipo tardio e pode reduzir a secreção de anticorpos (Rodrigues et al., 2000 e Schop, 2007), como também inibe a ligação de IgG, bloqueio da fixação de C3 e da via de ativação de complemento pela via clássica (Moretti et al., 2008).

Outros antígenos polissacarídeos importantes para a proteção do fungo são os **glicofingolipídeos (GSL)** que estão envolvidos no processo de interação célula-célula, medeiam a apoptose, atuam na adesão do patógeno a células do hospedeiro e implicam no crescimento do fungo. Anticorpos contra esses antígenos, *in vitro*, inibem a formação de novas células, bem como o crescimento de cepas acapsuladas e

capsuladas do *C.neoformans*, sendo este processo independente do sistema complemento (Rodrigues et al., 2000).

Outros fatores de virulência são: **a produção de lacase** que está relacionada com a patogenicidade do *Cryptococcus* sp porque possui efeitos antioxidantes e, *in vitro*, induz a formação de melanina a partir de adrenalina, dopamina e noradrenalina, presentes em grande quantidade no SNC que, por sua vez, interferem com a resposta celular do hospedeiro ou potencializam a neurotoxicidade do fungo (Harrison, 2000 e Wuang et al., 1996); **a produção de manitol** que tem papel na proteção da levedura frente ao ataque oxidativo dos fagócitos, do *stress* osmótico e extracelularmente, pode contribuir para o aumento da pressão intracraniana (Harrison, 2000); **a produção de melanina**, um radical livre que impede a morte intracelular nos macrófagos, porque protege o fungo contra oxidantes derivados de nitrogênio e oxigênio produzidos durante a fagocitose no interior dos fagócitos. A enzima superóxido dismutase suplementa a atividade da melanina, por converter os radicais superóxidos em peróxidos de hidrogênio e oxigênio molecular (Schop, 2007) e a **termotolerância** (Moretti et al., 2008) (tabela 2).

Tabela 2: Fatores de virulência do *Cryptococcus* sp

Fator de virulência	Mecanismo
1. Cápsula polissacarídica	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Impede a fagocitose ✓ Protetora de proteína fúngica: potencialmente opsonizante ✓ Indutora da liberação de moléculas de adesão dos leucócitos ✓ Inibe a diapedese
2. Lacase	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Ativa a produção de: <ul style="list-style-type: none"> -Catecolaminas oxidadas: neurotóxicas -Melanina: proteção contra radicais oxidantes ✓ Inibição da enzima ferro-oxidase: redução da formação de radicais hidroxila em macrófagos
3. manitol	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Proteção contra reações oxidativas ✓ Proteção contra “stress” osmótico ✓ Potencializador do aumento da pressão intracraniana
4. Melanina	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Proteção contra radicais oxidantes ✓ Impede a morte intracelular

4. Manifestações Clínicas

A criptococose é uma micose sistêmica de porta de entrada inalatória que acomete órgãos profundos e a pele de humanos e de outros mamíferos, com principal tropismo pelo SNC (Crissey et al., 1995; Lima, 1998; Mitchell, 1998 e Moretti et al., 2008). Sua frequência vem aumentando desde a década de 1980, especialmente em imunodeprimidos (Sidrim, 1999). A doença está frequentemente associada à infecção pelo HIV ou a outras situações que ocasionem imunossupressão, como: diabetes, hepatopatias, imunodeficiências primárias, sarcoidose, leucemias crônicas, uso de corticóides, alcoolismo, entre outras (Batista; Silva, 1991; Lacaz et al., 1991;

Ramirez et al., 1994, Mitchell et al., 1995; Khanna et al., 1996; Lima, 1998; Botha; Wessels, 1999; Núñez et al, 1999 e Harrison, 2000).

A micose abrange duas formas distintas do ponto de vista clínico e epidemiológico: a **criptococose oportunista**, cosmopolita, associada a condições de imunodepressão celular causada predominantemente por *Cryptococcus neoformans* e, a **criptococose primária** de hospeiro aparentemente imunocompetente, endêmica em áreas tropicais e subtropicais, causada predominantemente por *Cryptococcus gattii* (Moretti et al., 2008).

A infecção humana geralmente é acidental e ocorre pela inalação de células leveduriformes não-encapsuladas ou esparsamente encapsuladas que atingem o parênquima pulmonar podendo provocar reações tissulares e ativar o sistema imunológico (Batista; Silva, 1991; Crissey et al., 1995 e Brummer; Stevens, 1999). Essas reações, geralmente, controlam a infecção. Caso isso não ocorra, a infecção pode permanecer localizada ou disseminar-se pelo organismo (Batista; Silva, 1991; Rippon, 1982). Alguns autores acreditam que a pele e a via digestiva também possam ser portas de entrada do fungo no organismo (Sidrim, 1999).

Não há relatos de grandes surtos de pneumonia criptocócica associados a fontes ambientais comuns, sugerindo que a maioria das infecções seja subclínica e que a resistência natural ao patógeno é importante na progressão da doença. A criptococose, então, pode ser o primeiro sinal de imunodeficiência (Batista; Silva, 1991 e Sidrim, 1999).

Os quadros clínicos da criptococose são na maioria das vezes assintomáticos, podendo ocorrer quadro pulmonar, disseminado, neurológico e cutâneo primário (Sidrim, 1999).

A **criptococose assintomática** provavelmente tem acometimento pulmonar, entretanto, em geral não resulta em sintomatologia clínica ou os sintomas clínicos passam despercebidos (Sidrim, 1999).

A **criptococose pulmonar** pode ser assintomática ou até atingir formas graves de disseminação local ocasionando a Síndrome do Desconforto Respiratório do Adulto (SDRA) (Batista; Silva, 1991; Lacaz et al. 1991, Sidrim, 1999). Em imunocompetentes, a doença pode ocasionar apenas infecção latente com nódulos pulmonares. Já nos pacientes com alterações imunológicas pode ocorrer a reativação dos focos primários latentes, com disseminação, em especial, para o SNC, produzindo meningite ou meningoencefalite (Helou et al., 1999).

Os sintomas clínicos podem ser febre elevada, tosse, emagrecimento, como também presença de líquido pleural, dor torácica e hemoptise. O comprometimento pulmonar pode ser isolado ou associado a outras localizações; pode ainda não ser evidente mesmo em casos de criptococemia e meningite. A presença de altos títulos séricos do antígeno capsular implica em profunda invasão tecidual e, provavelmente, em doença disseminada (Saag et al., 2000).

Um estudo retrospectivo de 36 autópsias de pacientes com criptococose pulmonar demonstrou, na maioria dos pacientes, algum tipo de comprometimento imunológico ocasionado por doença debilitante, utilização de quimioterapia ou corticosteróides. Foram encontrados ainda quatro subtipos de padrão histológico no pulmão dos pacientes: granuloma, pneumonia granulomatosa, infecção intracapilar/intersticial e envolvimento maciço do pulmão. Os autores não conseguiram correlacionar maior gravidade ou aumento da mortalidade com o

predomínio de algum dos quatro subtipos histológicos encontrados (McDonell; Hutchins, 1985).

A **disseminação da criptococose** não é um fato comum, já que o SNC é o principal foco de disseminação do fungo, mas os quadros de onde se isolam o *C.neoformans* do sangue vêm aumentando em frequência. A principal via de disseminação é a sangüínea, porém, também há relatos de disseminação pela via linfática. Quaisquer órgãos podem ser infectados, mas alguns autores consideram a próstata uma fonte residual do fungo, explicando as freqüentes recaídas em imunodeprimidos (Sidrim, 1999).

A **neurocriptococose** é representada, geralmente, por uma lesão simples ou maciça, multifocal, na forma de meningoencefalite, de evolução grave e fetal, acompanhada ou não, de lesão pulmonar evidente, fungemia e focos secundários para pele, ossos, rins e supra-renal (Saag et al, 2000 e Moretti et al., 2008). O tropismo do *C.neoformans* pelo SNC ainda é pouco explicado, entretanto, sabe-se que a composição química do líquido, rico em substratos para a fenoloxidase, tais como a dopamina, fazendo com que este seja um meio de cultura enriquecido para a levedura e, a ausência habitual de reação inflamatória no cérebro, associada à ausência de anticorpos específicos, favorece a instalação do fungo (Batista; Silva, 1991; Lacaz, et al. 1991; Sidrim, 1999 e Moretti et al., 2008).

Os sintomas mais observados na neurocriptococose são cefaléia bem localizada que se intensifica com a evolução clínica, náusea, vertigens e febre, com ou sem associações de distúrbios visuais, de memória, sono e humor (Lacaz et al., 1991; Powderly, 1993 e Sidrim, 1999). O líquido mostra-se geralmente claro, com albumina elevada, glicose baixa e linfocitose de 200 a 800 células/mL. Em muitos casos, uma

hipertensão no LCR pode ser observada, sendo este um sinal de mau prognóstico para o paciente (Sidrim, 1999).

A **criptococose cutânea primária** ocorre devido à inoculação traumática da levedura, entretanto, a maioria dos casos resulta de uma disseminação da infecção. As lesões primárias apresentam-se com características pleomórficas, como: pápulas, pústulas, celulite e ulcerações únicas ou múltiplas. Já as lesões de pele originadas da disseminação têm um tropismo pela face e membros, sendo muito semelhantes às lesões de *Molluscum contagiosum* ou lesões herpéticas (Sidrim, 1999).

5. Sistema Imunológico na Criptococose

Os tecidos dos mamíferos apresentam um ambiente desfavorável para o *Cryptococcus* sp, mesmo na ausência de imunidade específica anti-criptococos. O fungo precisa sobreviver em alta temperatura corpórea, pH levemente alcalino, depleção de nutrientes e em constante ataque das células do hospedeiro (Casadevall; Perfect, 1998). Assim, o organismo dos mamíferos está inicialmente protegido por uma combinação de barreiras físico-químicas e uma cascata de células efetoras capazes de matar ou inibir o fungo, o que justifica a baixa frequência de infecções sintomáticas apesar da alta exposição ao *Cryptococcus* sp (Casadevall; Perfect, 1998).

Após a instalação da levedura no organismo do hospedeiro, essas encontram, basicamente, quatro linhas de defesa do sistema imune, que são: a) Os macrófagos

alveolares; b) As células fagocíticas inflamatórias; c) sistema complemento e, d) a resposta adquirida (Brummer; Stevens, 1999) que tentam eliminar o patógeno do organismo, atuando através de um padrão de resposta Th1 e com a liberação de citocinas por estímulo de macrófagos (Moretti et al., 2008).

A. Macrófagos alveolares

Cryptococcus sp encontra, nos espaços alveolares, os macrófagos, porém, a baixa concentração de proteínas opsonizantes facilita a instalação da levedura (Brummer; Stevens, 1999). Harrison em 2000, demonstrou que os macrófagos não ativados são capazes de fagocitar as células do *Cryptococcus* sp opsonizadas, porém, não são capazes de matar o fungo e, Mitchell et al, em 1995, mostraram que a suscetibilidade das cepas fagocitadas não está relacionada com o tamanho da célula encapsulada ou acapsulada. Apesar disto, os macrófagos desempenham um papel importante como células apresentadoras de antígenos (APC) (Vecchiarelli et al, 1994).

Cryptococcus sp também é capaz de sobreviver e se multiplicar em células da microglia humana (Lee et al., 1995), bem como no interior dos fagolisossomas de macrófagos (Levitz et al., 1999). Isso mostra como o fungo é resistente ao pH ácido do fagolisossoma, o que sugere estratégias para o tratamento e profilaxia da doença.

B. Células Inflamatórias

A produção de citocinas pró-inflamatórias pelos monócitos/macrófagos é outro mecanismo de defesa contra o *Cryptococcus* sp, já que a atividade dos macrófagos alveolares contra o fungo é fraca ou principalmente fungistática (Brummer; Stevens, 1999). Estudos experimentais demonstraram que a neutralização das citocinas com AcMo induz significativa diminuição da resposta inflamatória pulmonar em camundongos infectados com a levedura por via intratecal (Huffnagle et al., 1997).

Huang e Levitz, em 2000, mostraram que não há diferenças significativas entre a produção de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com criptococose e HIV positivos ou pacientes com criptococose e HIV negativos e, concluíram que a resposta inflamatória deficiente nos pacientes com criptococose e HIV positivos não deve ocorrer devido a deficiência ou diminuição de produção das citocinas, mas sim a uma hiporresponsividade das células inflamatórias às citocinas produzidas, acarretando em uma resposta inflamatória insuficiente na infecção pelo fungo.

Além das células inflamatórias e dos macrófagos, as células *natural Killer* (NK), também inibem diretamente o *Cryptococcus* sp (Murphy, 1999).

C. Sistema Complemento

O sistema complemento é formado por proteínas plasmáticas, produzidas em sua maior parte no fígado, tem papel importante na resposta imune do organismo e é ativado durante os processos inflamatórios ou danos teciduais. As principais funções

do sistema complemento são: ativar e lisar células, fornecer opsoninas para a fagocitose, eliminar imunocomplexo, fornecer fatores quimiotáticos que ativam a migração de células inflamatórias e participar das reações de auto-imunidade e hipersensibilidade (Janeway, et al., 2002; Abbas, et al. 2005).

A ativação do sistema complemento é em cascata e pode ocorrer por três diferentes vias que convergem para a ativação de C3 iniciando a via efetora comum que é responsável pelo depósito das proteínas do complexo de ataque a membrana (MAC): via clássica (dependente de anticorpo), via alternativa e via das lectinas (figura2) (Janeway, et al., 2002; Abbas, et al. 2005).

C.1. Via Clássica

A ativação da via clássica é cálcio dependente e inicia-se com a ligação de C1 à porção Fc do anticorpo, durante o reconhecimento imunológico do antígeno por um anticorpo específico. Entre as classes de imunoglobulinas, a classe IgM apresenta ligação mais eficaz com C1, e, em seguida, as sub-classes de IgG: IgG3, IgG1 e IgG2 (Figuerola; Densen, 1991).

A ativação desta via gera fragmentos, que podem apresentar funções coadjuvantes nos processos inflamatórios e anafiláticos, como os peptídeos N-terminal: C4a, C3a e C5a, secretados a partir da ativação de C4, C3 e C5, respectivamente (Bing; Alper, 1995) (figura 2).

C.2. Via Alternativa

A ativação da via alternativa se caracteriza pela presença de proteínas que interagem com a superfície do patógeno formando o complexo C3 convertase que ativa a proteína C3 iniciando a formação do MAC e liberando anafilatoxinas (C3a e C5a) que aumentam a quimiotaxia de células inflamatórias (Janeway, et al., 2002) (figura 2).

C.3. Via das Lectinas

A terceira via de ativação do complemento é denominada via das lectinas, onde a proteína ligante de manose (MBL) pode iniciar o processo de ativação, independentemente da presença de anticorpos ou C1q (Holmskov et al., 1994) (figura 2).

A principal função biológica da MBL é a opsonização, pois a lectina liga-se aos carboidratos presentes na superfície de microorganismos, e as estruturas de colágenos são ligantes para receptores de colectina presentes nos fagócitos, além de atuar como mediador para ativação da via clássica do sistema complemento (Holmskov et al., 1994 e Eisen; Minchinton, 2003). Estudos demonstraram que a lectina apresenta afinidade por carboidratos (**manose**, N-acetil-manosamina, N-acetil-glicosamina e L-fucose-glicose) presentes em fungos, vírus, bactérias e parasitos (Holmskov et al., 1994; Polotsky et al, 1997; Jensenius, 1995 e Eisen; Minchinton, 2003).

A MBL une-se ao seu ligante e inicia a ativação do sistema complemento através do complexo MASP1/MASP2, C4 e C2, até a formação de C3 convertase (Thiel et al., 1992). O depósito de fatores do complemento na superfície do microorganismo promove a opsonização e, conseqüentemente, facilita a fagocitose pelos PMN. Assim, a MBL também representa papel crucial na fase inicial das infecções, antes que a resposta imunológica específica seja estabelecida (Sumiya et al., 1991).

C.4. Via Efetora Comum

Após a ativação de C3 com liberação de C3a e C3b, a C5 convertase é produzida e ocorre a ativação sucessiva de C5 até C9, a via efetora do sistema complemento. O complexo C5b a C9 produz um canal transmembrana, o MAC, que resulta na lise celular (Janeway et al., 2002 e Abbas et al., 2005)

Figura 2: Resumo dos principais componentes e ações efetoras do Sistema Complemento.

As células encapsuladas do *Cryptococcus* sp são potentes ativadores da via alternativa e, a ativação do Sistema Complemento é essencial para a opsonização do fungo encapsulado. A incubação das células encapsuladas com soro normal humano leva a ativação e ligação de 10^7 a 10^8 moléculas de C3, sendo a cápsula, o alvo destas moléculas (Truelsen et al., 1992). Diamond et al. (1974), verificaram que células do *Cryptococcus* sp são fagocitadas em número muito maior quando são pré-incubadas com soro normal humano.

Wilson e Kozel (1992), verificaram que os criptococos encapsulados ativam somente a via alternativa do Sistema complemento e, que, *in vitro*, a incubação destas células com os componentes reconstituídos da via alternativa levam a ativação e ligação de moléculas de C3 que são quali e quantitativamente idênticas ao depósito de C3 que ocorre em soro normal humano. As possíveis alternativas para a ausência da ativação da via clássica seriam que a cápsula impede a ligação de IgG na parede celular, como também, impede o acesso dos componentes da via clássica aos sítios de ativação na parede celular.

A contribuição da ativação da via alternativa na proteção do hospedeiro foi demonstrada por Marcher et al. (1978), que avaliaram pacientes com criptococose disseminada. Os pacientes mostraram deficiências na via alternativa como: perda da atividade hemolítica, diminuição da opsonização, baixos níveis de C3 e pequena deposição de C3 em células do *Cryptococcus* sp encapsulados concluindo que a depleção de C3 é responsável pela perda do processo de opsonização e incapacidade no controle da infecção.

Estudos demonstraram que há grande quantidade de moléculas de C3 no tecido pulmonar de camundongos infectados por criptococos e que este alto nível de C3

explica a maior predileção do criptococos pelo pulmão de camundongos deficientes de C5 (Truelsen et al., 1992). Camundongos deficientes de C5 desenvolvem pneumonia criptocócica aguda e fatal; enquanto, camundongos C5 normais não desenvolvem. Alguns estudos mostraram que a fagocitose de *Cryptococcus* sp por macrófagos de camundongos depende da presença dos componentes intactos do sistema complemento e, que em camundongos deficientes de C5, a fagocitose está diminuída apesar da grande deposição de C3b sobre a cápsula (Truelsen et al., 1992 e Brummer; Stevens, 1994)

A ausência de C3 depositados em criptococos encontrados no tecido cerebral é explicada pela ausência de componentes da via alternativa neste local e, explicaria a rara presença de infiltrados inflamatórios em lesões cerebrais criptocócicas (Diamond et al., 1974). A concentração de C3 em LCR é apenas de 3 µg/mL, enquanto que, no soro a concentração atinge valores em torno de 1170 µg/mL, o que facilita a permanência da levedura no sistema nervoso (Truelsen et al., 1992).

Ainda em relação ao depósito de moléculas de C3 sobre a cápsula do *Cryptococcus* sp. Washburn et al, 1991, demonstraram que os sorotipos B e C ligam-se a, aproximadamente, metade das moléculas de C3 que os sorotipos A e D ativam e, quando há depleção das cadeias laterais de xilose e glucuromil da manose, a quantidade de depósito é equivalente nos 4 sorotipos.

Estudo relacionando a ativação do sistema complemento pelo *Cryptococcus* sp e o desenvolvimento de resposta inflamatória demonstrou que o mecanismo envolvido na produção e secreção de IL-8 por neutrófilos humanos expostos a levedura ou ao GXM são proteínas termolábeis, provavelmente, C3a e C5a, já que

anticorpos contra esses peptídeos foram capazes de reduzir a produção de IL-8 pelas células inflamatórias (Vecchiarelli et al., 1998).

A parede celular do fungo quando melanizada não altera a cinética ou a total deposição de fragmentos C3, ativando, portanto, o sistema complemento (Rosas et al., 2002)

Eisen e Minchinton, (2003) relataram que a MBL exerce um papel importante na imunidade inata às infecções por bactérias, vírus, parasitos e **fungos**. A manana é o principal componente da parede celular dos fungos e a MBL se liga com grande afinidade ao *Cryptococcus* sp, *Candida albicans* e *Aspergillus fumigattus*. MBL depositada em células capsuladas de *Cryptococcus* sp aumentam a opsonização por monócitos, neutrófilos e macrófagos, enquanto apenas o depósito de MBL em células acapsuladas estimula a produção de citocinas por células inflamatórias. O aumento da secreção de TNF por monócitos ativados por manoproteínas do *Cryptococcus* sp é dose-dependente da ligação de MBL na levedura.

Em resumo, o sistema complemento contribui para a defesa do organismo contra o *Cryptococcus* sp de diferentes maneiras: secretando opsoninas e fatores quimiotáticos e colaborando com a ação dos anticorpos específicos, aumentando a interação entre a imunidade inata e adquirida.

D. A resposta adquirida

Os pacientes com criptococose, em geral, apresentam algum defeito no desenvolvimento da resposta celular e, geralmente, apresentam baixa reatividade cutânea quando inoculados com diferentes antígenos fúngicos da pele em

comparação com indivíduos normais (Graybill, 1974). A imunidade específica contra o *Cryptococcus* sp se desenvolve em resposta a infecção ou imunização de produtos da levedura e, tem como função conter e/ ou erradicar a doença.

A imunidade celular envolve a ativação de linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ que reconhecem os antígenos criptocócicos e secretam citocinas capazes de eliminar o fungo do organismo (Brummer, 1999). Em modelos experimentais, foi demonstrado que tanto os LTCD4⁺ como os LTCD8⁺ recrutam monócitos e PMN para o foco da infecção e, que o LTCD8⁺ tem um papel importante na resposta protetora através da secreção de citocinas como o IFN- γ (Huffanagle et al., 1994). Kawakami et al, 1999, utilizando também modelos experimentais concluíram que a neutralização de IL-4 aumenta a produção de IFN- γ no foco infeccioso e a sobrevivência dos animais, mostrando a importância da resposta Th 1 na proteção da criptococose.

Apesar da resposta imune celular ser o principal mecanismo de eliminação do fungo, há evidências que a produção de anticorpos específicos atuem como eficientes opsoninas para a fagocitose, aumentam o “clearance” de GXM capsular circulante em modelos experimentais e, são responsáveis pela ativação do mecanismo de ADCC ativando células NK contra o fungo (Lamura et al., 2000 e Kwon et al., 2002). A resposta humoral envolve principalmente anticorpos contra antígenos polissacarídes da cápsula, em especial o GXM (Blumer; Kaufman, 1977 e DeShaw; Pirofski, 1995) e é comum e detectável em 80% dos indivíduos normais. Estudos sorológicos usando ensaios imunoenzimáticos com polissacarídes sugerem que a infecção subclínica é muito comum entre adultos imunocompetentes (Goldman, 2001). Kimball (1967) apud Casadevall e Perfect (1998), demonstraram uma correlação inversa entre níveis séricos de GXM e anticorpos sugerindo que a

sorologia negativa podia refletir o seqüestro de anticorpos por imunocomplexos. O encontro de anticorpos contra o GXM em indivíduos sem criptococose ainda não foi totalmente elucidado. As evidências sugerem que esse achado explicaria as infecções assintomáticas ou reações cruzadas com antígenos capsulares de outros patógenos, como, por exemplo, *Trichosporum* sp.

A resposta sorológica ao GXM mostra que são comuns as infecções subclínicas em adultos imunocompetentes, porém, as crianças apresentam uma resposta pobre a antígenos polissacarídeos, levando a necessidade de se estudar a produção de anticorpos a antígenos protéicos (Goldman et al., 2001). Lamura et al., 2000, identificaram anticorpos em pacientes HIV positivos contra 4 antígenos não capsulares imunodominantes sugerindo que esses podem representar alvos moleculares importantes da resposta humoral. Essas proteínas apresentam pesos moleculares de 48, 43, 38 e 26Kda e o aparecimento de anticorpos específicos a esses antígenos está relacionado com a diminuição de GXM circulante.

Os anticorpos dirigidos ao GXM são potentes opsoninas e aumentam a fagocitose de *Cryptococcus* sp. Estudos com administração de AcMo contra o antígeno, em modelos experimentais, mostraram que essa inoculação prolonga a sobrevivência e/ou reduz o número de colônias fúngicas, como também, a administração após a infecção pelo *C.neoformans* aumenta a eficácia da terapêutica com antifúngicos (Casadevall; Perfect, 1998 e Netski; Kozel, 2002).

Os anticorpos anti-GXM não são diretamente tóxicos à parede celular do *Cryptococcus* sp; são responsáveis por mediar a proteção aumentando a eficácia das células do hospedeiro contra a levedura. Assim, promovem a fagocitose, aumentando a resposta inflamatória e, conseqüentemente, aumentam a apresentação de antígenos

e expressão de moléculas co-estimulatórias e citocinas, modificando, portanto, o curso da infecção. A ausência de anticorpos séricos contra antígenos capsulares implica em um mau prognóstico para os pacientes, apesar da baixa imunogenicidade dos antígenos capsulares e a resposta a antígenos protéicos ser pouco estudada (Casadevall et al., 2002). Os anticorpos IgG anti-GXM podem ser usados como marcadores de infecção latente podendo indicar aumento do risco para o desencadeamento da doença em indivíduos imunocomprometidos (Haupt et al., 1994).

DeShaw e Pirofski (1995), estudaram a soroprevalência de anticorpos anti-criptococos em 70 pacientes HIV positivos e 53 pacientes HIV negativos e verificaram que a presença de anticorpos IgM, IgG e IgA é semelhante em ambos os grupos, com predomínio da subclasse IgG2, isótipo associado a resposta contra antígenos polissacarídeos (Kwon et al., 2002). A função biológica das imunoglobulinas séricas anti-criptococos também foram analisadas por Zhong e Pirofski (1996), que imunizaram indivíduos normais com o antígeno GXM associado a toxóide tetânico (GXM-TT) e verificaram que os anticorpos da subclasse IgG2 foram capazes de aumentar a fagocitose por células mononucleares humanas independentes da cooperação de linfócitos T, sugerindo que essa imunoglobulina poderia ser utilizada na terapia da doença em pacientes HIV+.

Estudos mostraram que a prevalência de anticorpos IgA e IgG em crianças de 1 a 12 anos imunocompetentes, infectadas por *Cryptococcus gattii* na Austrália foi de 75% e 100%, respectivamente, demonstrando que o aumento de anticorpos está mais associado a infecções pela espécie *gattii*. Os níveis de IgG persistem por 2 anos, porém, a IgA decai com o término da infecção (Speed et al., 1996).

Anticorpos IgM e IgA contra o GXM capsular promovem fagocitose por macrófagos independente do sistema complemento com eficiência comparável a IgG1 e é proporcional a expressão do receptor de complemento 3 (CR3). A fagocitose pelos isótipos IgM e IgA é inibida por níveis de GXM solúvel que se ligam a moléculas de CD18, sugerindo uma nova ponte entre a resposta inata e específica (Taborda; Casadevall, 2002).

Em resumo, os anticorpos anti-GXM possuem numerosas atividades biológicas: a) opsonização para fagocitose, b) ativação da via clássica do complemento resultando na deposição precoce de fragmentos de C3 no fungo, c) supressão do excesso de acúmulo de C3 pela via alternativa; d) facilitação do clareamento do GXM do soro *in vivo*, resultando no maior acúmulo de GXM nos tecidos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear; e) proteção em modelos murinos da criptococose e, f) facilitação de vários aspectos da imunidade celular ao *Cryptococcus* sp (Brandt et al., 2003).

6. Justificativa

A ativação do sistema complemento contribue para a resposta inata contra o *Cryptococcus* sp de diferentes maneiras: secretando opsoninas (C3b e C5b), fatores quimiotáticos (C5a), como também estudos mostram que altas concentrações de MBL sérica podem facilitar a invasão de microorganismos intracelulares facultativos nos fagócitos, aumentando a patogênese da doença específica (Garred et al., 1997) e, colaborando com a ação dos anticorpos específicos, porém não há relatos da atividade do sistema complemento *in vivo* durante a criptococose. A resposta de anticorpos são importantes para a delimitação do processo infeccioso por *Cryptococcus* sp, como também, a administração de anticorpos monoclonais podem inibir a liberação do GXM mediando a proteção contra o fungo (Martinez et al., 2004), mas não há relatos na literatura da resposta de anticorpos produzidos durante a infecção por *Cryptococcus* sp. Sabemos que a neurocriptococose é considerada a terceira doença mais frequente em pacientes HIV positivos e, portanto é classificada como oportunista, entretanto, indivíduos supostamente saudáveis não conseguem impedir a infecção e a doença, mostrando que o *Cryptococcus* sp não é oportunista e sim, um agente de doença sistêmica.

II. OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a atividade do sistema complemento e a produção de anticorpos específicos anti-GXM e anti- proteínas brutas (Ag S) dos cinco sorotipos de *Cryptococcus* sp em amostras séricas de pacientes com neurocriptococose HIV negativos.

Objetivos específicos

- a-** Quantificar o antígeno capsular GXM solúvel
- b-** Avaliar a atividade funcional das vias clássica (CH 50) e alternativa (APH 50) do sistema complemento.
- c-** Quantificar a proteína MBL.
- d-** Determinar a reatividade de anticorpos IgG e IgA anti-GXM e antígeno protéicos brutos (Ag S).
- e-** Correlacionar a quantidade de antígeno GXM com os níveis de anticorpos específicos, MBL e atividade do sistema complemento.

III. MÉTODOS

1. População estudada

A população estudada neste projeto foi pacientes com neurocriptococose de ambos os sexos, sem restrição de idade e encaminhados pelo Ambulatório do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER) e pelo Ambulatório de Infectologia do Hospital das Clínicas de São Paulo (HC-FMUSP) no período de julho de 2002 a dezembro de 2004. Os pacientes incluídos no estudo apresentaram sintomas como cefaléia, febre, náuseas e vômitos associados ou não com alterações do nível de consciência e distúrbios visuais. Os critérios de exclusão foram gestação, terapia prolongada com antiinflamatórios esteroidais e/ou terapias com imunossupressores, doenças hematológicas, portadores de tumores, diagnóstico prévio de imunodeficiência primária ou secundária ou infecções associadas (HIV, hepatite B, hepatite C, sífilis, toxoplasmose ou tuberculose). Todos os pacientes com neurocriptococose tiveram suas amostras de LCR e/ou sangue encaminhadas para o Laboratório do Instituto de Infectologia Emílio Ribas para a confirmação do diagnóstico de neurocriptococose através das seguintes avaliações:

- a) pesquisa direta do fungo: coloração com Tinta da China e visualização da levedura.
- b) aglutinação do látex: detecção do antígeno GXM.
- c) cultura do sedimento liquorico em ágar Sabouraud e ágar Niger: para confirmação do gênero e identificação da espécie e variedade do fungo.

Foram consideradas amostras positivas aquelas em que a pesquisa direta do fungo possibilitou a visualização da levedura e/ou a prova da aglutinação do látex

apresentou-se positiva e/ou a cultura possibilitou o isolamento do fungo. As culturas positivas foram posteriormente confirmadas (gênero, espécie e variedade).

A confirmação do gênero *Cryptococcus* foi realizada através das colônias obtidas após o cultivo do material biológico em ágar Sabouraud e/ou ágar Niger. Em ágar Sabouraud a levedura cresce facilmente, quando incubada por 3 dias à temperatura ambiente, formando colônias brilhantes, viscosas, úmidas e de coloração creme (Lacaz et al., 2002). A confirmação da espécie foi realizada através da prova de urease (*Cryptococcus neoformans* é urease positiva) e/ou através da visualização de colônias marrons (pigmento melanóide) em ágar Niger, após 3 dias de incubação em temperatura ambiente (Lacaz et al., 2002).

A confirmação da espécie de *Cryptococcus* sp foi realizada no laboratório de Micologia do Instituto de Medicina Tropical-IMT-SP através do cultivo das amostras de LCR, cedidas pelo Laboratório do IIER, em ágar Canavanina-CGB (Canavanina-glicina e azul de bromotimol) por, até 3 dias, em temperatura ambiente (Lacaz et al., 2002). Amostras de *C.gattii* são capazes de alterar a coloração do meio de cultura, tornando-o azul; a espécie *neoformans* por sua vez, não é capaz de promover a mesma alteração (a cor do meio permanece a inalterada)

Dois outros grupos foram incluídos no estudo: um grupo de indivíduos saudáveis com alta exposição ao fungo (granjeiros de ambos os sexos, maiores de 15 anos, provenientes da cidade de Jumirim, localizada no estado de São Paulo, na região localizada entre Botucatu e Sorocaba a 164 km da cidade de São Paulo (figuras 3 e 4), com clima ameno e temperatura média de 20° C e, um grupo de indivíduos saudáveis com baixa exposição ao fungo, moradores da cidade de São Paulo.

Figura 3: Mapa do Estado de São Paulo.

Fonte: www.sp-turismo.com/mapas.htm, acesso em 21 de julho de 2011 às 22:30horas

Figura 4: Cidade de Jumirim localizada no estado de São Paulo a 164km da cidade de São Paulo, entre as cidades de Botucatu e Sorocaba.

Fonte: : www.sp-turismo.com/municipios-sp.htm, acesso em 21 de julho de 2011 às 22:30horas

Foram avaliados, um total de 106 indivíduos divididos em 3 grupos:

Grupo 1: Indivíduos com neurocriptococose e sorologia negativa para o HIV (pacientes) (n= 23).

Grupo 2: Indivíduos saudáveis com alta exposição ao fungo e sorologia negativa para o HIV (granjeiros) (n=23).

Grupo 3: Indivíduos saudáveis com baixa exposição ao fungo e sorologia negativa para o HIV (grupo controle) (n= 60).

O estudo proposto foi aprovado pela Comissão de Ética Médica do HC-FMUSP e do Instituto de Infectologia Emílio Ribas- IIER. Todos os indivíduos foram informados sobre os aspectos científicos da pesquisa de forma clara e em termos simples e da necessidade de se coletar sangue por punção intravenosa e as amostras de sangue só foram coletadas após o consentimento verbal e escrito de cada um (Anexo A).

Com a finalidade de avaliar a exposição dos indivíduos e pacientes ao *Cryptococcus* sp e com base nos dados epidemiológicos encontrados na literatura, foi preenchido um questionário (Anexo B), previamente validado (Rocha, 2006), durante a coleta, de sangue de cada indivíduo, que foi identificado por um número conhecido apenas pelo pesquisador principal, garantindo a confidencialidade das informações.

O sangue periférico (10 mL) foi coletado após o consentimento pelo paciente ou responsáveis e as amostras de soro foram estocadas, imediatamente, em 4 alíquotas à -80°C para posterior análise (complemento e anticorpos). A coleta de sangue periférico dos pacientes ocorreu entre julho de 2002 a dezembro de 2004. A coleta de sangue periférico dos indivíduos do grupo 2 e do grupo 3 ocorreu em julho de 2003.

Com o objetivo de avaliar a ativação do sistema complemento e a produção de anticorpos específicos anti-GXM e anti-AgS dos grupos 1, 2 e 3 foram realizadas as seguintes avaliações:

- ✓ Quantificação de GXM circulante
- ✓ Avaliação do Sistema Complemento
- ✓ Avaliação da produção de anticorpos específicos anti-criptococos

2. Quantificação do título do antígeno capsular GXM circulante

Para a determinação do título do antígeno GXM nas amostras de soro dos grupos sintomáticos foi utilizado o teste de aglutinação para antígeno de *Cryptococcus* sp da IMMUNO-MYCOLOGICS, Inc®. Para determinar o título de GXM circulante, todas as amostras de soro positivas para GXM foram diluídas na razão 2 (1/2 a 1/1024) e o título de antígeno GXM foi estabelecido sendo a última diluição que sofreu aglutinação com as partículas de látex sensibilizadas.

3. Avaliação do Sistema Complemento

As amostras de soro utilizadas para avaliação do sistema complemento foram aliquotadas e armazenadas a -70°C até o momento do uso, descongeladas em banho maria a 37°C e mantidas em gelo, para não ocorrer ativação inespecífica do sistema complemento.

3.1. Ensaio Hemolítico para dosagem da via clássica (CH 50) (Waage et al., 1996, modificada)

Hemácias de carneiro foram lavadas em tampão veronal (VBS) (Veronal de sódio 5mM-tamponado com salina 142mM, pH7,4 contendo 0,15mM CaCl^{+2} , 1mM MgCl^{+2} e 1% de gelatina (GVBS-Mg) por 5 minutos a 2500 rpm a 4°C , até a inibição de lise espontânea. Uma suspensão a 2% da papa de hemácias em tampão GVBS-Mg foi sensibilizada com anticorpo anti-hemácias de carneiro (hemolisina) a 1/500, para formação do sistema hemolítico (SH). Após incubação em banho-maria a 37°C por 30 minutos o SH foi lavado uma vez a 2500 rpm por 5 minutos a 4°C e ressuspensionado no mesmo volume de tampão GVBS-Mg. O SH foi armazenado a 4°C até o momento do uso ou por até 4 dias.

As amostras de soro foram diluídas em série (1/20 a 1/160) em tampão GVBS-Mg em gelo e 150 μL foram transferidos para as cavidades de uma placa de fundo

redondo e adicionado 50 μ L do SH. Em cada placa também foi realizado uma curva padrão onde K0= 150 μ L de tampão GVBS-Mg + 50 μ L de SH; K50= 175 μ L de H₂O destilada + 25 μ L de SH e K100=150 μ L de H₂O destilada + 50 μ L de SH.

As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C em câmara úmida, centrifugadas por 3 minutos a 1000 rpm a 4°C e 50 μ L do sobrenadante foi transferido para uma placa de fundo chato com 200 μ L de H₂O destilada.

A leitura das absorbâncias foi feita em Leitor de ELISA a 414nm. As absorbâncias das amostras foram plotadas em gráfico, onde o eixo X corresponde as unidades de complemento (20 a 160) e o eixo Y corresponde aos valores das absorbâncias encontrados. O resultado foi expresso em UI/mL.

Os valores de normalidade já padronizados em nosso laboratório com 60 amostras de soro de voluntários saudáveis mostraram que a média de lise foi de 114 UI/mL e a faixa de normalidade é de 63 a 170 UI/mL

3.2. Ensaio Hemolítico para dosagem da via alternativa (AP 50) (Joiner et al., 1983- modificada)

Hemácias de coelho foram lavadas em tampão GVBS-Mg-EGTA® (tampão VBS contendo 1% de gelatina, 10mM MgCl⁺² e 10mM EGTA®) por 5 minutos a 2500 rpm a 4°C, até a inibição de lise espontânea. Foi então realizada uma suspensão a 2% da papa de hemácias em tampão GVBS-Mg-EGTA e armazenadas a 4°C até o momento do uso ou por até 4 dias.

As amostras de soro foram diluídas em série (1/10 a 1/80) em tampão GVBS-Mg-EGTA® em gelo e 150µL transferidos para as cavidades de uma placa de fundo redondo e foi adicionado 50µL da suspensão de hemácias. Em cada placa foi realizado uma curva padrão onde K0= 150µL de tampão GVBS-Mg-EGTA® + 50µL da suspensão de hemácia; K50= 175µL de H₂O destilada + 25µL da suspensão de hemácia e K100=150µL de H₂O destilada + 50µL da suspensão de hemácia.

As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C em câmara úmida, centrifugadas por 3 minutos a 1000 rpm a 4°C e 50µL do sobrenadante foi transferido para uma placa de fundo chato com 200µL de H₂O destilada.

A leitura das absorbâncias foi feita em Leitor de ELISA a 414nm. As absorbâncias das amostras foram plotadas em gráfico, onde o eixo X corresponde as unidades de complemento (10 a 80) e o eixo Y corresponde aos valores das absorbâncias encontrados. O resultado foi calculado em percentual de hemólise em relação aos soros normais.

Os valores de normalidade já padronizados em nosso laboratório com 60 amostras de soro de voluntários saudáveis mostraram que a média de lise foi de 26 UI/mL e a faixa de normalidade é de 16 a 36 UI/mL .

3.3. Dosagem da proteína MBL (Frederiksen et al., 2006 – modificada)

Este ensaio foi estabelecido com a colaboração dos Profs. Jens Christian Jensenius da Universidade de Aarhus, Dinamarca e Michael Kirschfink do Instituto de Imunologia da Universidade de Heidelberg, Alemanha.

Placas NUNC Maxisorp® foram sensibilizadas com AcMo 131-1 anti-MBL humano diluído em tampão bicarbonato pH 9,6 0,06M a 1µg/mL. Após incubação por 18 horas à 4°C em câmara úmida e ciclo de lavagens com tampão contendo salina e fosfatos acrescido de detergente Tween 20® (PBS-T20 0,2%) as amostras de soro e curva padrão diluídos em tampão diluente (PBS-T20 0,2% + EDTA 10mM + leite desnatado 2%) foram adicionados as cavidades e incubados por 1 hora a 37°C em câmara úmida. Novo ciclo de lavagens e foi adicionado o AcMo anti-MBL humano conjugado a biotina a 0,2 µg/mL diluído em tampão PBS-T20® 0,2% suplementado com leite desnatado 2% e incubado por 1 hora a 37°C em câmara úmida. As placas foram lavadas com tampão de lavagem e foi adicionado o conjugado avidina-peroxidase a 1/500 diluída em tampão PBS-T20® 0,2% e leite desnatado 2%. Após 1 hora de incubação a 37°C em câmara úmida as placas foram lavadas com tampão de lavagem e foi adicionado 100µL da solução cromogênica (TMB- Calbiochem®) pronta para uso.

A reação enzimática foi interrompida após 20 minutos com a adição de 50µL de H₂SO₄ 0,18M e, a leitura foi realizada em leitor de microplaca a 450nm.

4. Avaliação da produção de anticorpos específicos anti-criptococos

4.1.Obtenção dos antígenos de *Cryptococcus* sp: GXM e antígeno somático

Sorotipos A (cepa 300), B(cepa 412), C (cepa 79) e D (cepa 167) de *Cryptococcus* sp utilizados neste estudo foram extraídos do cultivo *in vitro* da levedura encapsulada e não encapsulada mantido em caldo Sabouraud dextrose com moderada rotação (120 rpm) rotineiramente no Laboratório de Micologia do IMT-SP e gentilmente cedidos ao nosso laboratório para posterior preparação. Para obtenção de células encapsuladas para extração do antígeno GXM, a cultura foi mantida por 15 dias à 25°C; já para extração do antígeno protéico (AgS) o cultivo das células não encapsuladas foi de 3 a 4 dias à 30°C.

4.1.1. Antígeno GXM de *Cryptococcus* sp

A cultura de *Cryptococcus* sp encapsulados foi centrifugada a 2000 rpm por 15 minutos a fim de obter um sobrenadante limpo. O sobrenadante foi transferido para um frasco graduado e o volume final anotado antes de filtrar utilizando filtro de 0,45 µm. Foi adicionado, vagarosamente, acetato de sódio (em pó) ao recipiente contendo o sobrenadante filtrado e 2,5 volumes de etanol a 95-100% para precipitar o

polissacarídeo do *Cryptococcus* sp (PSCN). O frasco permaneceu em temperatura ambiente ou a 4°C. A solução sofreu clareamento à medida que o PSCN formou uma película no fundo do frasco. O sobrenadante foi decantado e o frasco invertido para permitir a secagem do excesso de líquido. O PSCN foi dissolvido em uma quantidade mínima de H₂O destilada.

A concentração de polissacarídeo foi medida pelo método de Dubois a fim de permitir o cálculo da quantidade de PSCN presente. Para cada 10 ml de solução de PSCN obtido foi adicionado 400µL de solução de NaCl a 5M e a seguir, três vezes o volume de PSCN de uma solução de 0,3% de CTAB®. A mistura foi centrifugada a 2000 rpm por 15 minutos e o precipitado obtido foi lavado com etanol a 10% em H₂O destilada. O precipitado de CTAB®-GXM foi dissolvido em NaCl 1M e acrescentado, gota a gota, etanol a 95%. Após a centrifugação, o precipitado foi dissolvido em NaCl 2M. A solução foi transferida para uma bolsa de diálise com limite de exclusão de 10kD e dialisada contra uma solução de NaCl 1M. O material final obtido foi liofilizado e ressuspensão na hora de uso com o mínimo volume de água possível.

4.1.2. Antígeno somático de *Cryptococcus* sp

As células do cultivo de *Cryptococcus* sp provenientes do antígeno metabólico foram lavadas em PBS pH 7,2, 0,001M estéril, maceradas mecanicamente com auxílio de “pó de vidro”estéril e ressuspensas em PBS com inibidor de proteases

(fenilmetilsulfonilfluoreto-FMSF) na concentração final de 4,4 mg/mL. Após repouso de 48 horas a 4°C, foram centrifugadas e o sobrenadante utilizado como antígeno somático. A dosagem protéica foi obtida pelo método de Lowry e as alíquotas foram mantidas a -20°C até o momento do uso.

4.2. Detecção de anticorpos IgG anti-GXM e anti-antígeno protéico bruto (AgS), padronizado “*in house*”

Os anticorpos IgG reativos aos antígenos GXM e Ag S foram determinados por ELISA. O soro de cada amostra de sangue foi aliquoteado e armazenado a -70°C até o momento do uso.

Placas NUNC® Maxisorp foram sensibilizadas com antígeno GXM (5µg/mL) e Ag S (5µg/mL) em tampão bicarbonato-carbonato, pH 9,6, 0,06M. Após incubação por 2 horas a 37°C e 18 horas à 4°C em câmara úmida, as placas foram lavadas com PBS-T20® 0,01% (tampão de lavagem) e o bloqueio dos sítios remanescentes foi feito com 200µL de leite desnatado (LD) a 5% em PBS-T20 por 2 horas a 37°C em câmara úmida. Após ciclo de lavagens com PBS-T20®, os soros foram diluídos a 1/100 em tampão PBS-T20®-LD 2,5% e adicionados em duplicata às cavidades. Foram incubados por 1 hora a 37°C em câmara úmida e submetidos a novo ciclo de lavagens com tampão, adicionando-se o conjugado anti-IgG humana diluído à 1/12000 em PBS-T20-LD. Após incubação por 1 hora a 37°C em câmara úmida, as placas foram lavadas e adicionou-se 100µL da solução cromogênica (TMB-

Calbiochem®) pronta para uso. A reação enzimática foi interrompida após 15 minutos com a adição de 50µL de H₂SO₄ 0,18M e, a leitura foi realizada em leitor de microplaca a 450nm. As diluições do conjugado usadas nos testes foram estabelecidas previamente. A quantidade de anticorpos foi expressa em densidade óptica (DO).

4.3. Detecção de anticorpos IgA anti-GXM e anti-AgS, padronizado “*in house*”

Os anticorpos IgA reativos aos antígenos GXM e Ag S foram determinados por ELISA. O soro de cada amostra de sangue foi aliquoteado e armazenado a -70°C até o momento do uso.

Placas NUNC® Maxisorp foram sensibilizadas com antígeno GXM (5µg/mL) e Ag S (5µg/mL) em tampão bicarbonato-carbonato, pH 9,6, 0,06M. Após incubação por 2 horas a 37°C e “overnight” à 4°C em câmara úmida, as placas foram lavadas com PBS-T20® 0,01% (tampão de lavagem) e o bloqueio dos sítios remanescentes foi feito com 200µL de LD a 5% em PBS-T20 por 2 horas a 37°C em câmara úmida. Após ciclo de lavagens com PBS-T20®, os soros foram diluídos a 1/100 em tampão PBS-T20®-LD 2,5% e adicionados em duplicata às cavidades. Foram incubados por 1 hora a 37°C em câmara úmida e submetidos a novo ciclo de lavagens com tampão, adicionando-se o conjugado anti-IgA humana diluído à 1/7000 (anti-GXM) e 1/4000 (anti-AgS) em PBS-T20®-LD. Após incubação por 1 hora a 37°C em câmara úmida, as placas foram lavadas e adicionou-se 100µL da solução cromogênica (TMB-

Calbiochem®) pronta para uso. A reação enzimática foi interrompida após 15 minutos com a adição de 50µL de H₂SO₄ 0,18M e, a leitura foi realizada em leitor de microplaca a 450nm. As diluições do conjugado usadas nos testes foram estabelecidas previamente. A quantidade de anticorpos foi expressa em densidade óptica (DO)

5. Avaliação estatística

Foi realizado o estudo estatístico da população, com especificação das distintas variáveis estudadas (idade, sexo, diagnóstico e resultados de exames), com médias, medianas e desvio padrão, no caso de variáveis contínuas e percentagem, nas qualitativas.

A comparação de dados contínuos foi avaliada usando teste *t* de Student. O teste de Kruskal-Wallis foi usado para comparar os diferentes resultados nos três grupos estudados, enquanto para a comparação entre dois grupos foi utilizado o teste *U* não paramétrico de Mann Whitney. O valor de *p* <0.05 foi considerado significativo. Os coeficientes de correlação foram avaliados utilizando o teste de Spearman's.

IV. RESULTADOS

1. População estudada

Foram coletadas 106 amostras de soro e divididas em 3 grupos. Dois pacientes do grupo 1 foram excluídos do estudo, pois, apresentavam tumores (timoma e câncer de pulmão). A idade média do grupo 1 foi de 38,8 anos (16M:5F; 15-66 anos); no grupo 2 foi de 50,5 anos (13M:10F; 16- 75 anos) e no grupo 3, a média de idade foi de 36,5 anos (25M:35F;23-65 anos) (tabela 3) (figura 5).

Cryptococcus gatti foi isolado e identificado em cinco (23,80%) culturas de líquido cefalorraquidiano, não foi possível isolar a espécie nas demais amostras.

2. Quantificação do título do antígeno capsular GXM circulante

Foi determinado o título de GXM do antígeno capsular GXM, polissacarídeo presente na cápsula do *Cryptococcus* sp, circulante no soro de pacientes, indivíduos saudáveis com alta exposição e indivíduos saudáveis com baixa exposição à levedura.

Na tabela 3, a maioria dos pacientes (16/21; 76,19%) do grupo 1 apresentou altos títulos de GXM sérico (títulos ≥ 256) e apenas uma paciente do sexo feminino (1/21; 4,76%) apresentou título de GXM sérico inferior a 16. Setenta e seis por cento (16/21) dos pacientes deste grupo são do sexo masculino e 81,25% (13/16) apresentaram carga fúngica elevada ($\geq 1/256$) (figura 5).

No grupo 2, de indivíduos saudáveis com alta exposição ao fungo, 91,3% (21/23) apresentaram títulos de GXM indetectáveis e em dois indivíduos do sexo masculino, os títulos foram de 1/32 e 1/256. No grupo 3, indivíduos saudáveis com baixa exposição ao fungo, todos (60/60; 100%) apresentaram títulos inferiores a 16, ou seja, nenhum indivíduo foi positivo para presença do fungo.

A mediana da concentração de GXM circulante nas amostras de soro de em pacientes com neurocriptococose foi de 1024 (64-1024). Comparando-se com os três grupos, houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,0001$; $r^2 = 0,6181$).

Tabela 3: Características epidemiológicas e título de GXM circulante nos grupo 1 (pacientes com neurocriptococose ativa), grupo 2 (granjeiros saudáveis e com alta exposição ao fungo) e grupo 3 (indivíduos saudáveis com baixa exposição ao fungo).

	N	Idade(média) anos	Sexo		Título de GXM sérico		
			M	F	≤ 16	16-256	≥ 256
Grupo 1	21	38,8 (15 a 66)	16	5	1 (4,76%)	4 (19,04%)	16 (76,19%)
Grupo 2	23	50,5 (16 a 75)	13	10	21 (91,3%)	2 (8,7%)	0
Grupo 3	60	36,5 (23 a 65)	25	35	100% (60)	0	0

Figura 5: Distribuição por sexo e título de GXM circulante nos grupo 1 (pacientes com neurocriptococose ativa) e grupo 2 (granjeiros saudáveis e com alta exposição ao fungo).

3. Avaliação do sistema complemento

3.1. Ensaio hemolítico para dosagem da via clássica (CH 50)

Os valores de normalidade já padronizados em nosso laboratório com 60 amostras de soro de voluntários saudáveis mostraram que a média de lise foi de 114 UI/mL e a faixa de normalidade é de 63 a 170 UI/mL.

A frequência de pacientes com neurocriptococose ativa (grupo 1) com níveis de CH50 dentro da normalidade foi de 80,95% (17/21), 56,52% (13/23) para o grupo 2 e 98,33% (59/60) para os indivíduos saudáveis com baixa exposição. Valores baixos, próximos do limite inferior de normalidade foram observados em 19,05% (4/21), 34,78% (8/23) e 1,67% (1/60) indivíduos dos grupos 1, 2 e 3, respectivamente. A mediana dos valores de CH 50 foi de 98 UI/mL (67- 115 UI/mL) no grupo 1, 61 UI/mL (50- 80 UI/mL) no grupo 2 e 115,5 UI/mL (93,5-137 UI/mL) no grupo 3 sendo significativamente diferente entre os 3 grupos (Kruskall-Wallis, $p<0,0001$). O grupo 2 mostrou significativa redução nos valores em comparação aos valores dos grupos 1 e 3 (figura 6). A média dos valores encontrada foi, respectivamente, para os grupos 1, 2 e 3 de 94 UI/mL; 66 UI/mL e 114 UI/mL.

Os valores de CH 50 do grupo 1 apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparados com o grupo 2 (Mann-Whitney, $p=0,0013$) e com o grupo 3 (Mann-Whitney, $P=0,0096$). Os valores de CH 50 do grupo 2 e grupo 3 também diferiram estatisticamente (Mann-Whitney, $p<0,0001$).

Figura 6: Ativação da via clássica (CH 50) em amostras séricas dos indivíduos do grupo 1 (pacientes com neurocriptococose); grupo 2 (indivíduos com alta exposição ao fungo) e grupo 3 (indivíduos saudáveis com presumida exposição baixa ao fungo) (UI/mL).

Todos os pacientes que vieram a óbito tinham valores de CH 50 dentro da normalidade.

3.2. Ensaio hemolítico para dosagem da via alternativa (AP 50)

Os valores de normalidade já padronizados em nosso laboratório com 60 amostras de soro de voluntários saudáveis mostraram que a média de lise foi de 26 UI/mL e a faixa de normalidade é de 16 a 36 UI/mL.

A frequência de pacientes (grupo 1) com níveis de AP 50 dentro da normalidade foi de 52,38% (11/21); comparada com os grupos 2 e 3 que foram de 91,30% (21/23) e 100% (60/60), respectivamente. Valor baixo, perto do limite inferior de normalidade foi observado em um paciente (4,76%) do grupo 1 e, outro paciente (4,76%) deste grupo apresentou níveis indetectáveis desta via. As medianas dos valores obtidos foram 33 UI/mL (25-43,5 UI/mL), 31 UI/mL (28-34 UI/mL) e 26 UI/mL (23-30UI/mL) nos grupos 1, 2 e 3, respectivamente. As medianas variaram significativamente (Kruskal-Wallis, $p=0,0005$) entre os três grupos. As médias encontradas nesses grupos foram de: 39 UI/mL; 30 UI/mL e 26 UI/mL, respectivamente (figura 7).

Os valores de AP 50 do grupo 1 apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao grupo 3 (Mann-Whitney, $p=0,0070$). Os valores de AP 50 dos grupos 2 e 3 também foram estatisticamente diferentes (Mann-Whitney, $p=0,0005$). Não houve diferença significativa ao comparar os grupos 1 e 2 (Mann-Whitney, $p=0,5646$).

Figura. 7: Ativação da via alternativa (AP 50) em amostras séricas dos indivíduos do grupo 1 (neurocriptococose ativa); grupo 2 (indivíduos com alta exposição ao fungo) e grupo 3 (indivíduos saudáveis com presumível exposição baixa ao fungo) (UI/mL).

3.3. Dosagem da proteína MBL

Os valores de normalidade já padronizados em nosso laboratório com 60 amostras de soro de voluntários saudáveis mostraram que a mediana dos valores de MBL foi de 3.332 ng/mL.

As medianas das dosagens obtidas nos grupos estudados foram de 7.280 ng/ml (2.478-10.790 ng/mL) no grupo 1; 2.605 ng/mL (1.901- 5.513 ng/mL) no grupo 2 e 5.353 ng/mL (1.653-8.932 ng/mL) no grupo 3. As médias dos valores de MBL obtidas foram: 7.116 ng/mL; 3.281 ng/mL e 8.932 ng/mL nos grupos 1, 2 e 3, respectivamente. Diferenças significativas foram observadas nas dosagens de MBL nos três grupos (Kruskal-Wallis, $p=0,0277$) (figura 8).

Houve diferença estatisticamente significativa para os valores de MBL do grupo 1 comparado com o grupo 2 (Mann-Whitney, $p=0,0091$). Não houve diferença significativa entre os valores de MBL dos grupos 1 e 3 (Mann-Whitney, $p=0,2213$) ou entre os grupos 2 e 3 (Mann-Whitney, $p=0,0514$).

Dois pacientes (9,52%, 2/21) do grupo 1 apresentaram baixa concentração de MBL sérica (563 ng/mL e 310 ng/mL). No grupo 2, dois indivíduos (8,69%) apresentaram concentração inferior a 1.000 ng/mL e, um indivíduo apresentou níveis indetectáveis de MBL sérica (4,34%, 1/23). A frequência de MBL sérica inferior a 1000 ng/mL foi de 15 % (9/60) nos indivíduos saudáveis (grupo 3).

Figura. 8: Dosagem da proteína MBL em amostras séricas dos indivíduos do grupo 1 (neurocriptococose ativa); grupo 2 (indivíduos com alta exposição ao fungo) e grupo 3 (indivíduos saudáveis com presumida exposição baixa ao fungo) em ng/mL.

Os valores de MBL encontrados nas amostras de soro dos pacientes que vieram a óbito foram: 5.661, 1.126, 1.218 e 7.348 ng/mL e, o título de GXM desses pacientes era: 1/512, 1/1024, 1/1024 e 1/1024 respectivamente. Entre os pacientes com baixos valores de MBL (563 e 310 ng/mL) os títulos de GXM foram respectivamente 1/512 e 1/1024.

Na tabela 4, as amostras foram distribuídas por faixa de concentração de MBL e verificou-se que 42,85% (9/21) dos pacientes (grupo 1) apresentaram concentrações superiores a 8932 ng/mL, o mesmo ocorrendo com os grupos 2 e 3 onde a frequência foi de 73,19% e 50% respectivamente.

Tabela 4: Distribuição das amostras séricas nos diferentes grupos por faixas de concentração de MBL.

	Concentração de MBL em ng/ mL		
	Até 1653*	1653 a 8932	≥ 8932**
Grupo 1	5 (23,8%)	9 (42,85%)	7 (33,3%)
Grupo 2	5 (21,75%)	17 (73,91%)	1 (4,34%)
Grupo 3	15 (25%)	30 (50%)	15 (25%)

* valor do percentil 25 no grupo 3

** valor do percentil 75 no grupo 3

4. Avaliação da produção de anticorpos específicos anti-criptococcus

4.1. Detecção de anticorpos IgG anti-GXM e anti-antígeno protéico bruto (AgS), padronizado “*in house*”.

Anticorpos IgG anti-GXM foram avaliados por ELISA e expressos em densidade óptica (DO). IgG anti-GXM foi detectado em todos os grupos com diferenças significativas entre eles (Kruskal-Wallis, $P=0,0127$). As medianas de IgG anti-GXM (DO) foram 1.017 (0,255 a 1.217) no grupo 1, 1.260 (0,815 a 2.479) no grupo 2 e 0,680 (0,321 a 1.295) no grupo 3. As médias obtidas em cada grupo foram: 1.191 (grupo 1), 1.572 (grupo 2) e **0,965 (grupo 3)** (figura 9).

Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos 2 e 3 (Mann-Whitney, $P=0,0046$). A comparação dos valores de densidade óptica de IgG anti-GXM entre os grupos 1 (neurocriptococose ativa) e 2 (indivíduos com alta exposição ao fungo e saudáveis), não mostrou-se significativa (Mann-Whitney, $P=0,1805$), assim como entre os grupos 1 e 3 (Mann-Whitney, $P=0,1645$).

Figura. 9: IgG anti- GXM expresso em densidade óptica nos três grupos: grupo 1 (neurocriptococose ativa); grupo 2 (indivíduos com alta exposição ao fungo) e grupo 3 (indivíduos saudáveis com presumida exposição baixa ao fungo)

Cinquenta e dois por cento (11/21) dos pacientes do grupo 1 e 60% (14/23) dos indivíduos do grupo 2 apresentaram DO de IgG anti-GXM superior a média obtida pelo grupo 3 (média: 0,965).

Na tabela 5 distribuiu-se as amostras por faixa de DO de anticorpos IgG anti-GXM e verificou-se que 19,04% (4/21) respondem com DO superior ao cut off durante a infecção. O grupo 2 que apresenta exposição estável 39, 13% (9/23) respondem com anticorpos acima do corte de reação e, no grupo 3 a frequência de anticorpos acima do cut off foi de 21, 66% (13/60).

Tabela 5: Distribuição da frequência das amostras séricas nos diferentes grupos por faixas de DO de anticorpos IgG anti-GXM.

	DO de IgG anti-GXM		
	Até 0,321*	0,321 a 0965	≥ 0,965**
Grupo 1	2 (9,52%)	8 (38,09%)	4 (19,04%)
Grupo 2	1 (4,34%)	8 (34,78%)	14 (60,86%)
Grupo 3	15 (25%)	22 (36,67%)	23 (38,33%)

*Percentil 25 do grupo 3

** média do grupo 3

A densidade óptica dos anticorpos IgG específicos anti- AgS (proteínas da parede celular do *Cryptococcus* sp) foi mensurada por ELISA e não houve diferença entre os três grupos. As medianas observadas foram 0,641 (0,340-1.662); 0,601 (0,147-2.427) e 0,707 (0,116-3.101) nos grupos 1, 2 e 3, respectivamente (Kruskal-

Wallis, $p=0,509$) (figura 10). As médias de DO encontradas foram: 0,988 (grupo 1); 0,769 (grupo 2) e 0,927 (grupo 3). Quando os grupos foram comparados aos pares também não foram encontradas diferença estatisticamente significativas: grupos 1 e 2 (Mann-Whitney, $p= 0,5569$); grupos 1 e 3 (Mann-Whitney, $p= 0,8420$) e, grupos 2 e 3 (Mann-Whitney, $p= 0,2280$).

Figura. 10: IgG anti-AgS nos três grupos expresso em densidade óptica: grupo 1 (neurocriptococose ativa); grupo 2 (indivíduos com alta exposição ao fungo) e grupo 3 (indivíduos saudáveis com presumida exposição baixa ao fungo).

4.2. Detecção de anticorpos IgA anti-GXM e anti-antígeno protéico bruto (AgS), padronizado “*in house*”.

Anticorpos IgA anti-GXM foram mensurados por ELISA e expressos por densidade óptica (DO). Detectou-se anticorpos IgA anti-GXM em todos os grupos. As medianas de DO mostraram diferença significativa entre os três grupos (Kruskal-Wallis, $p=0,03$). A mediana de anticorpos IgA anti-GXM foi 0,057 (0,035 a 0,175) no grupo 1, 0,070 (0,046 a 0,182) no grupo 2 e 0,044 (0,026 a 0,072) no grupo 3. As médias encontradas para cada grupo foram: 0,098 (grupo 1); 0,111 (grupo 2) e 0,065 (grupo 3) (figura 11). Houve diferença estatisticamente significativa comparando-se os valores de densidade óptica encontrados nos grupos 2 e 3 (Mann-Whitney, $p=0,0142$). Ao comparar o grupo 1 (pacientes com doença ativa) com o grupo 2 (indivíduos saudáveis com alta exposição ao fungo) (Mann-Whitney, $p=0,5569$) ou com o grupo 3 (indivíduos saudáveis com baixa exposição ao *Cryptococcus* sp) (Mann-Whitney, $P=0,1084$) não foram observadas diferenças significativas.

Figura 11: IgA anti- GXM nos três grupos expressos em densidade óptica: grupo 1 (indivíduos com neurocriptococose ativa); grupo 2 (indivíduos com alta exposição ao fungo) e grupo 3 (indivíduos saudáveis com presumida exposição baixa ao fungo).

A leitura da densidade óptica dos anticorpos IgA específicos anti-AgS (proteínas da parede celular do *Cryptococcus* sp) por ELISA e a mediana de IgA anti AgS foi 0,122 (0,082- 0,188) no grupo 1; 0,155 (0,078- 0,266) no grupo 2 e 0,133 (0,076- 0,158) no grupo 3 (Kruskal-Wallis, $p= 0,554$). As médias de IgA anti-AgS foram: 0,1355 (grupo 1); 0,1805 (grupo 2) e 0,1566 (grupo 3) (figura 12). Quando os grupos foram comparados aos pares também não foram diferentes estatisticamente: grupos 1 e 2 (Mann-Whitney, $p= 0,3473$); grupos 1 e 3 (Mann-Whitney, $p= 0,7465$) e, grupos 2 e 3 (Mann-Whitney, $p= 0,3338$).

Figura 12. IgA anti-AgS nos três grupos expresso em densidade óptica: grupo 1 (indivíduos com neurocriptococose ativa); grupo 2 (indivíduos com alta exposição ao fungo) e grupo 3 (indivíduos saudáveis com presumida exposição baixa ao fungo).

5. Correlação entre a quantidade de MBL e os títulos de GXM nas amostras séricas dos três grupos.

Na tabela 6 compararam-se valores de MBL em ng/mL com o título de GXM circulante e observou-se a frequência nos 3 grupos. No grupo 1 observou-se que 61,9% (13/21) dos pacientes apresentava concentração de MBL igual ou maior que 4500 ng/mL e títulos superiores a 256 de GXM circulante. No grupo 2, com alta exposição ao fungo, verificou-se que a maioria (16/23; 69,59%) apresentavam baixos valores de MBL (inferior a 4.500 ng/mL) e títulos de GXM indetectáveis. No soro de dois indivíduos assintomáticos deste grupo, obteve-se concentração de MBL de 1.771 ng/mL para um título de GXM de 1/256 e concentração de 3.324 ng/mL para outro indivíduo com título de GXM igual a 1/32. No grupo 3, 48,33% apresentaram valores de MBL inferiores a 4500 ng/mL e títulos indetectáveis de GXM.

Tabela 6: Comparação entre os títulos de GXM circulante e os valores de MBL (ng/mL) em amostras séricas no grupo 1 (neurocriptococose ativa), grupo 2 (indivíduos com alta exposição ao fungo) e grupo 3 (indivíduos saudáveis com presumida exposição baixa ao fungo).

		Concentração de MBL em ng/mL					
		Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3	
Título de GXM circulante	< 256	< 4500	≥ 4500	< 4500	≥ 4500	< 4500	≥ 4500
		3 (14,28%)	2 (9,52%)	16 (69,56%)	6 (26,08%)	29 (48,33%)	31 (51,66%)
	≥ 256	3 (14,28%)	13 (61,9%)	1 (4,34%)	0	0	0

6. Correlação entre a resposta de anticorpos e os títulos de GXM nas amostras séricas dos três grupos.

Considerando-se a média de DO = 0,965 (grupo 3), avaliou-se a resposta de IgG anti-GXM e GXM circulante nas 104 amostras de soro estudadas.

Observou-se que 62% (13/21) dos pacientes apresentaram baixa resposta de anticorpos e títulos de GXM a partir de 256 no grupo 1. No grupo 2, trinta e nove por cento (9/23) dos indivíduos foram reagentes para IgG mesmo na ausência de GXM circulante. Em um indivíduo foi detectado título de GXM circulante igual a 256 e DO de IgG anti-GXM superior a 1.762; o indivíduo com título de GXM igual a 1/32 apresentou DO de IgG superior ao corte (DO= 3.324). No grupo 3, todos eram

indetectáveis para GXM circulante e vinte e dois por cento foram reagentes para IgG anti-GXM (tabela 7).

Tabela 7: Comparação entre os títulos de GXM circulante e a produção de anticorpos IgG específicos anti-GXM em amostras séricas no grupo 1 (neurocriptococose ativa), grupo 2 (indivíduos com alta exposição ao fungo) e grupo 3 (indivíduos saudáveis com presumida exposição baixa ao fungo).

DO de anticorpos IgG anti-GXM										
		Grupo 1			Grupo 2			Grupo 3		
		< 0,965	≥ 0,965	Total	< 0,965	≥ 0,965	Total	< 0,965	≥ 0,965	Total
Título de GXM circulante	< 1/256	2	3	5	9	13	22	37	23	60
	≥ 1/256	8	8	16	0	1	1	0	0	0
	Total	17	4	21	9	14	23	47	13	60

7. Correlação entre a resposta de anticorpos e concentração de MBL nas amostras séricas dos três grupos.

Considerando-se como altas concentrações de MBL valores iguais ou superiores a 4500 ng/mL e altas densidades ópticas valores $\geq 0,965$ observou-se que a frequência de pacientes (grupo 1) com altas concentrações de MBL e baixos

V. DISCUSSÃO

Cryptococcus sp é um patógeno intracelular facultativo, saprófita que causa significativa morbimortalidade, principalmente, em pacientes com algum defeito na resposta imune, como por exemplo, HIV positivos ou outras doenças com comprometimento da imunidade mediada por linfócitos T (Osterholze et al., 2009). Além disso, observou-se que o fungo apresenta um grande potencial em causar doença em indivíduos imunocompetentes (Jain et al., 2009).

A micose, do ponto de vista clínico e epidemiológico, pode ser classificada em criptococose oportunista, cosmopolita, associada a condições de imunodepressão celular e, em geral, é associada, predominantemente, por *Cryptococcus neoformans*; e a criptococose primária de indivíduos imunocompetentes, endêmica em áreas tropicais e subtropicais, resultante, em sua maior parte, por *Cryptococcus gatti* (Moretti et al., 2008). *Cryptococcus neoformans* acomete aproximadamente um milhão de indivíduos HIV positivos por ano, ao contrário das infecções por *Cryptococcus gatti* que são menos comuns nestas situações. Assim, a hipótese mais usualmente aceita é que a virulência do *C.gatti* deve ser a responsável pela gravidade da doença em pacientes imunocompetentes (Cheng et al., 2009 e Price et al., 2011).

A infecção por *Cryptococcus* inicia-se por inalação de células acapsulares ou esparsamente capsuladas e, depois ocorre a síntese da cápsula polissacarídica, considerado o principal fator de virulência da levedura (Van der Wetering et al., 2004). A cápsula polissacarídica, cujo principal componente é o **GXM**, seguido de GalXM e MP inibe a fagocitose e, em consequência, sua rápida destruição por macrófagos (Kozel et al., 2003; Jain et al., 2006 e McFadden et al., 2006).

Observações experimentais indicam a existência de **criptococose-infecção**, ou seja, os indivíduos são reagentes ao teste intradérmico com a criptococina, porém são

assintomáticos (Lacaz et al., 1991) e, **criptococose-doença**, com sintomas pulmonares e/ou disseminados, principalmente, com tropismo para o sistema nervoso central (Moretti et al., 2008).

Em nosso trabalho foram avaliadas 104 amostras de soro divididas em três grupos, sendo: **grupo 1**- 21 pacientes com neurocriptococose, HIV negativos e com baixa exposição a levedura; **grupo 2**- 23 indivíduos saudáveis com alta exposição a levedura e **grupo 3**- 60 indivíduos saudáveis com baixa exposição a levedura. Observou-se que, no grupo 1, foi isolada e identificada a espécie de *Cryptococcus gatti* em cinco culturas de líquido cefalorraquidiano (5/21; 23,8%). Ao contrário, *Cryptococcus neoformans* foi isolado de culturas de líquido cefalorraquidiano de pacientes com neurocriptococose HIV positivos (7/24; 29,17%) também avaliados simultaneamente por nós (dados não apresentados). Inclusive, este fato e a observação de diferente evolução clínica entre os dois grupos levaram-nos a ampliar a avaliação imunológica de pacientes HIV negativos acometidos por essa infecção.

Tradicionalmente, o diagnóstico de neurocriptococose depende de cultura (teste de referência) e/ou da demonstração da levedura encapsulada no LCR por microscopia direta, através da coloração de tinta da Índia ou tinta nanquim (Saha, et al., 2008). Todos os pacientes do grupo 1 incluídos em nosso estudo foram avaliados para o diagnóstico da micose por cultura e/ou microscopia direta, além da sorologia negativa para HIV e outras doenças infecciosas pelo Laboratório do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER) e, questionados quanto a ausência de imunodeficiências ou uso de imunossupressores,.

A detecção do GXM, antígeno capsular polissacarídico do *Cryptococcus* sp por aglutinação do látex, pode ser realizado no sangue, urina, lavado brônquio

alveolar e no LCR. Na prática, a detecção de GXM circulante é feita no soro e no LCR e tem grande valor diagnóstico da doença (Grinsell et al., 2001), pois 90% dos pacientes com neurocriptococose são positivos para o antígeno no LCR e soro. Títulos de GXM igual 1:4 sugerem infecção por *Cryptococcus* sp e títulos acima de 1:8 sugerem criptococose - doença (Moretti et al., 2008 e Saha et al., 2008). Sendo assim, determinou-se o título de GXM circulante em todas as amostras séricas dos grupos 1 (com doença ativa), 2 e 3 ambos sem doença, porém com diferentes graus de exposição a levedura.

A frequência de positividade com títulos iguais ou superiores a 1/256 no grupo 1 foi de 76,19% (16/21), o que indica alta concentração de antígeno fúngico circulante. Setenta e seis por cento (16/21) dos pacientes do grupo 1 eram do sexo masculino e a maioria (81,25%; 13/16) apresentou carga fúngica elevada ($\geq 1/256$). Entre os pacientes sabidamente imunodeprimidos, isto é, com AIDS, a maioria apresentou títulos iguais à 1/1024 (19/24; 79,17%) e, também, 58% desses pacientes eram do sexo masculino e 85,71% (12/14) tinham altos títulos de GXM circulante (1/1024) (dados não apresentados).

Nossos resultados confirmam as observações relatadas por Grinsell et al. (2001) ao afirmar que os títulos de GXM sérico parecem ser maiores em indivíduos HIV positivos do que em indivíduos HIV negativos com a doença, provavelmente devido a um defeito na eliminação do antígeno por fagocitose levando ao acúmulo de GXM maior em pacientes HIV positivos que nos pacientes HIV negativos. Confirmam, ainda, as observações feitas por Moretti et al. (2008) que em pacientes imunodeprimidos, a meningoencefalite ocorre de modo agudo, principalmente em

pacientes do sexo masculino, com carga fúngica elevada, predomínio do *C.neoformans* e com ampla variação de sinais clínicos.

Analizando o grupo 2 (23 granjeiros) de indivíduos que estão rotineiramente expostos ao fungo, detectou-se dois indivíduos com títulos de GXM sérico. Ambos os indivíduos são do sexo masculino, nascidos na cidade de Jumirim, na época da coleta apresentavam 55 e 72 anos, e sempre trabalharam com granjas. O granjeiro de 55 anos apresentou título de 1/32 de GXM circulante enquanto o título de GXM no soro do granjeiro de 72 anos foi de 1/256. Ambos, não apresentaram até os dias de hoje qualquer manifestação clínica pulmonar ou no sistema nervoso central e, afirmaram, através de um questionário, nunca terem apresentado sinais e sintomas de meningite, doenças imunossupressoras ou fazerem uso de imunossupressores, sugerindo que a exposição frequente à levedura pode impedir a criptococose-doença como havia sido relatado por Lacaz et al. (1991).

No grupo 3, todas as amostras séricas foram negativas (100%; 60/60) para a presença de GXM confirmando o valor diagnóstico deste imunoensaio para a criptococose.

Esses resultados demonstram que em regiões onde a exposição à levedura é instável, como ocorre na cidade de São Paulo, fica difícil estabelecer uma população de indivíduos protegidos. Em regiões onde a exposição é estável, são observados indivíduos assintomáticos com antigenemia detectável, o que pode indicar que algum grau de imunidade impede o desenvolvimento de manifestações clínicas nessa população. Estudos longitudinais de acompanhamento clínico e laboratorial desses indivíduos permitiriam melhor compreensão deste mecanismo.

Quanto à resposta imunológica, estudos clínicos sugerem que a resposta imune celular intacta é a característica mais importante para a resolução da infecção humana e experimental da criptococose (Huffnagle et al., 1999; Harrison, 2000; Traynor et al., 2000). Os pacientes avaliados neste estudo foram, também, analisados para a imunidade celular (mediada por linfócitos T), considerando-se a morfologia, quantidade e funcionalidade das células e não foram observadas alterações que indicassem um defeito na resposta imune celular em pacientes com neurocriptococose comparando-se com os indivíduos saudáveis (Rocha, 2006). Foram realizados ensaios proliferativos de linfócitos T para o antígeno criptocócico e a resposta observada foi semelhante ao grupo controle.

Rocha (2006) verificou que a linfopenia e baixa expressão das subpopulações TCD4⁺ e TCD8⁺ não estava associada ao desenvolvimento da doença, porém, a elevada concentração de antígeno GXM circulante correlacionou-se com uma menor resposta imune celular antígeno específica e com a redução da expressão de receptores de quimiocina pelos leucócitos, o que poderia ter um efeito inibitório causado pelo fungo.

Observações experimentais mostram que os mecanismos imunológicos mediados pelo **sistema complemento** (Kozel, 1996) além das células NK (Miller et al, 1990), da produção de **anticorpos** contra os antígenos capsulares (Martinez, 2004) e ADCC (Haupt et al., 1994) exercem importante papel no clareamento e na eliminação do fungo.

Ainda, tendo em vista que o *Cryptococcus* sp pode evadir-se das defesas imunológicas em indivíduos supostamente imunocompetentes, Chen et al.(2008) sugeriram que uma predisposição genética seria um dos possíveis fatores que

induzem maior suscetibilidade à infecção pelo fungo em pacientes imunocompetentes. Sendo assim, decidiu-se avaliar a atividade do sistema complemento e a produção de anticorpos específicos anti-GXM e anti- proteínas brutas presentes na parede celular (Ag S) dos cinco sorotipos de *Cryptococcus* sp em amostras séricas de pacientes com neurocriptococose ativa HIV negativos. Além disso, foi feita a correlação com a resposta de indivíduos saudáveis HIV negativos e com diferentes graus de exposição ao fungo.

A resposta inata exerce uma especial importância nas reações anti fúngicas, é imediata e específica, sendo capaz de discriminar entre patógenos (não próprios) e o próprio, através do reconhecimento de padrões moleculares de microorganismos (PAMPs), entre eles, de uma variedade de fungos (Fujita et al., 2004).

Um dos principais mecanismos de defesa da resposta inata é o **sistema complemento** com todas suas proteínas solúveis, proteínas reguladoras e receptores celulares agindo em cascata para a formação do MAC que integrando com a membrana do patógeno forma poros que levam a lise osmótica da célula, no caso, o fungo (Speth et al., 2004).

O sistema complemento é considerado uma cascata de proteínas anti-patógeno que pode ser ativado pela via clássica (anticorpo-dependente), via alternativa (mediada pela superfície do patógeno) e via da lectinas, porém, diferenças na ativação do sistema complemento por *C.neoformans* e *C.gattii* podem ser importantes para explicar a virulência aumentada de algumas cepas do sorotipo B (*C. gattii*) (Voelz; May, 2010).

As vias clássica e alternativa do sistema complemento exibem padrões diferentes para os eventos iniciais da deposição de C3 em criptococos acapsulados e

encapsulados. *Cryptococcus* sp encapsulados ativam preferencialmente a via alternativa do sistema complemento, pois, a cápsula pode impedir o depósito de IgG, ou o acesso das proteínas da via clássica aos sítios de ativação na parede celular do fungo (Wilson; Kozel, 1992).

Os valores de CH 50 nos pacientes com doença ativa estiveram na sua maioria dentro da normalidade, assim como os valores dos grupos 2 e 3, diferindo estatisticamente. Trinta e quatro por cento dos indivíduos com alta exposição apresentaram valores no limiar inferior de normalidade e a média dos valores desse grupo foi de 66 UI/mL, o que pode ser explicado pela constante inalação de leveduras acapsuladas e a produção de anticorpos específicos contra o fungo.

Em estudos experimentais, diversos autores observaram que as leveduras encapsuladas ativam fortemente a via alternativa do sistema complemento (Kozel et al., 1998; Speth et al., 2004 e Mershon et al., 2009). A cápsula do *Cryptococcus* sp serve de sítio para ativação e depósito de fragmentos de C3, que são opsoninas facilitadoras de fagócitos. *Cryptococcus gattii* não parece ativar a via alternativa tão bem como o *C. neoformans*, pois, liga-se fracamente as moléculas de C3.

Em nossos resultados verificamos que os valores de AP50 no grupo 1 foram estatisticamente diferentes quando comparados com o grupo 3, mostrando que a via alternativa é fortemente ativada durante a infecção por *Cryptococcus* sp. Speth et al. (2004) afirmaram que o GXM estimula a produção de C3 em células peritônicas e a presença suficiente de proteínas do complemento bem como a disponibilidade de fragmentos de C3 para opsonização são pré-requisitos para a indução de TNF- α e IL-8 que aumentam digestão intracelular de células encapsuladas por PMN.

A frequência de óbitos entre os pacientes com neurocriptococose foi de 19,04% (4/21) e, desses apenas um (4,76%) apresentou valores indetectáveis das proteínas da via alternativa e, um paciente apresentou valor inferior ao limite inferior de normalidade (12 UI/mL). Em todos os pacientes que vieram a óbito observamos valores de CH50 dentro da normalidade.

A cooperação entre os PMN e os mecanismos de defesa humorais foi demonstrada pelo fato que a morte da levedura por neutrófilos é mais eficiente quando há opsoninas derivadas do sistema complemento (C3b, C4b ou C5b) ou anticorpos IgG depositados na cápsula do *Cryptococcus* sp (Vecchiarelli et al, 1998). Detectou-se ativação da via alternativa na maioria dos pacientes com neurocriptococose (20/21) e, a ativação dessa via ocorreu em todas as amostras séricas dos grupos de pacientes saudáveis com alta (grupo 2) e baixa (grupo 3) exposição ao fungo.

Esses resultados sugerem que a via alternativa é a primeira linha de defesa da resposta inata para inibir a instalação da levedura nos pulmões, porém não é a única via de ativação da resposta inata.

Apesar da via alternativa exercer função principal na eliminação da levedura, foi observado que a proteína MBL é capaz de ativar *in vitro* a deposição de C3 em *C. gatti*. em murinos (Mershon et al., 2009). A proteína MBL também exerce papel central na resposta inata, pois, deposita-se em carboidratos presentes na superfície de microorganismos mediando a opsonofagocitose iniciando a via das lectinas do sistema complemento. Na tuberculose, Garred et al. (1997) sugeriram que a proteína MBL facilita a entrada da micobactéria nos fagócitos, sítio de multiplicação das micobactérias e, **altos níveis** de MBL no plasma são uma **desvantagem** para o

hospedeiro. Eisen e Minchinton (2003) associaram a deficiência dos níveis de MBL com infecções bacterianas em pacientes com neutropenia e doença meningocócica.

Baseado nessas afirmações resolvemos quantificar a proteína MBL no soro dos pacientes com neurocriptococose, uma infecção causada por patógeno intracelular e, observamos que a média da concentração de MBL entre os pacientes foi de 7.116 ng/mL, sendo que entre os pacientes com concentrações de MBL iguais ou superiores a 4500ng/mL (concentração alta), 61,9% apresentou títulos de GXM superiores a 1/256, o que vai de acordo com o proposto por Garred et al. (1997) que altos níveis de MBL no plasma são uma desvantagem para a resposta imune.

Os níveis de MBL sérica entre os três grupos foram diferentes estatisticamente ($p= 0.0277$) e, ao comparar o grupo com doença ativa e o grupo com alta exposição ao fungo também observamos diferença estatisticamente significativa ($p= 0.0091$). Essas observações que pacientes com neurocriptococose apresentam níveis de MBL maiores que indivíduos saudáveis com alta exposição ao fungo, porém, níveis semelhantes com os dos indivíduos saudáveis com baixa exposição ao fungo, indicam que a proteína MBL deva estar envolvida na resposta imediata ao *Cryptococcus* sp ou facilitando a evasão do fungo para o interior dos macrófagos, ou na habilidade de disseminação da levedura ou na reativação dos granulomas formados. Porém, como na tuberculose (Garred et al., 1997), essas hipóteses não podem ser respondidas, indicando apenas uma forte presença da proteína MBL na resposta inata frente a levedura.

A resposta imune é o principal determinante da infecção criptocócica (Guillot, et al. 2008), entretanto, a maioria dos estudos é experimental e há poucas informações da resposta imune humana frente à infecção. Sendo assim, o outro alvo

do nosso estudo foi avaliar a resposta de anticorpos ao GXM e às proteínas da parede celular (Ag S) da levedura em pacientes com neurocriptococose HIV negativos correlacionando com os dados obtidos com indivíduos saudáveis com alta e baixa exposição ao fungo.

Observamos que 52,38% dos pacientes do grupo 1 produziam anticorpos IgG anti-GXM com DO superior a 0,965, fato que se repetiu no grupo 2 (14/23; 60,86%) e no grupo 3 (23/60; 38,33%). Esses resultados estão de acordo com a observação de Schop et al. (2007), que verificou que a maioria dos indivíduos se infecta principalmente durante a primeira infância e que ocorrem infecções repetidas durante a vida, pois, a levedura é ubíqua e acapsular quando no meio ambiente, sendo facilmente inalada.

Tendo em vista que o *Cryptococcus* sp é um fungo intracelular facultativo há controvérsias sobre a importância dos mecanismos mediados por anticorpos no clareamento efetivo do fungo, pois os anticorpos direcionados contra os antígenos capsulares do *Cryptococcus* sp são comumente encontrados em indivíduos com ou sem doença ativa. Em ambos os casos, os indivíduos imunocompetentes aparentam ter certo grau de imunidade ao GXM (Schop et al., 2007).

A administração passiva de anticorpos anti-capsulares prolonga a sobrevivência e/ou reduzem a carga fúngica em criptococose experimental (Voelz; May; 2010). Os anticorpos anti-criptococos aumentam sua função protetora por opsonização dependente de receptor Fc nos fagócitos e pela ativação da via clássica do sistema complemento. A especificidade dos anticorpos parece ter grande importância na proteção (Voelz ; May, 2010).

Em nosso estudo detectamos IgG anti-GXM em todos os grupos com diferenças significativa entre eles. Foi testado se essa resposta não poderia ser uma reação cruzada com antígenos fúngicos presentes em outras leveduras. Avaliamos a resposta de anticorpos IgG anti- GALXM, antígeno presente na parede celular de *Candida albicans*, levedura comensal da microbiota normal do intestino de mamíferos e, não foram observadas reações cruzadas (dados não apresentados).

A presença de anticorpos IgG anti-GXM foi relatada por Spoljar e Tomasié (2001) em amostras de soro de camundongos com a doença e camundongos saudáveis sugerindo que a presença de anticorpos IgG anti-GXM representa a exposição ao *Cryptococcus* na natureza bem como em infecções subclínicas.

Taborda e Casadevall (2002) verificaram que AcMo IgM, IgG1 e IgA anti-GXM são protetores em modelos experimentais com criptococose. Anticorpos IgM e IgA comumente ligam-se a cápsula do fungo em soro humano, podendo indicar um mecanismo importante de defesa.

Anticorpos IgA anti-GXM foram detectados em todos os grupos analisados com diferenças estatisticamente significativas entre eles. Quando comparamos o grupo 2, com alta exposição ao fungo e, o grupo 3 com baixa exposição ao fungo, foram observadas diferenças estatísticas, o que pode confirmar os dados observados por Taborda e Casadevall (2002). O grupo 1 não foi significativamente diferente quando comparado com os grupos 2 ou 3.

As análises foram direcionadas na detecção de GXM circulante e a presença de anticorpos IgG anti-GXM, porque o racional para obtenção de uma vacina para *Cryptococcus* sp que ative a produção de anticorpos anti GXM baseia-se na habilidade que esses anticorpos tem em aumentar a resposta do hospedeiro na

criptococose experimental, trazendo benefícios ao hospedeiro (Datta et al., 2008). A proteção mediada por vacinas nesses modelos foi associada com a redução dos títulos de GXM circulantes e produção de anticorpos específicos direcionados ao GXM que mostraram prolongar a sobrevivência de camundongos primoinfectados por criptococos (Datta et al.; 2008). Com base em nossos achados, valores altos de DO de anticorpos IgG anti-GXM são suficientes para proteger da infecção por *Cryptococcus sp* ou para o clareamento de GXM circulante em indivíduos com alta e estável exposição ao fungo.

Observamos que entre os dezesseis pacientes com altos títulos de GXM, cinquenta por cento teve alta produção de anticorpos. Quando esses mesmos parâmetros foram avaliados no grupo 3 com similar exposição ao fungo, observou-se que 61,66% (37/60) dos indivíduos saudáveis apresentam valores de DO de IgG anti-GXM inferiores a 0,965 e títulos de GXM circulante indetectáveis no soro. Já o grupo 2, onde os indivíduos relatam uma alta e estável exposição ao fungo a maioria (14/23; 60,86%) respondeu com produção de anticorpos superior a 0,965 e ausência de GXM circulante. Os dois indivíduos do grupo 2 com títulos de GXM circulante (1/256 e 1/32) apresentaram altos valores de DO de IgG anti-GXM (1.771 e 3.324).

Cinquenta e oito por cento dos pacientes HIV positivos e neurocriptococose apresentaram altos títulos de GXM e altas DO de anticorpos IgG anti-GXM (dados não apresentados).

Analizamos a produção de anticorpos contra antígenos brutos presentes na parede celular das leveduras acapsuladas, e não observamos diferenças entre os três grupos, o que confirma que o GXM é o principal fator de virulência do fungo.

Entre os quatro pacientes que faleceram observamos que 100% apresentavam valores de CH 50 dentro da normalidade, 50% tinham valores indetectáveis de AP 50; 100% apresentavam concentrações de MBL sérica superiores a 1000 ng/mL e cinquenta por cento tinham DO inferior a média de corte do grupo 3, o que pode sugerir que altas concentrações de MBL séricas são prejudiciais em infecções causadas por patógenos intracelulares e que a via alternativa exerce um papel importante na resposta imediata frente a infecção por *Cryptococcus* sp.

Este estudo é o primeiro a avaliar populações de pacientes com neurocriptococose HIV negativos e comparar com grupos de diferentes exposições ao mesmo fungo. É pioneiro, também, na análise da ativação do sistema complemento, principalmente a via das lectinas, sugerindo que níveis elevados da MBL possam aumentar a suscetibilidade de indivíduos previamente saudáveis em contato com *Cryptococcus*. Ainda, confirma-se o papel da via alternativa nesta infecção. Ressalta-se a eficácia dos anticorpos específicos no clareamento do GXM, fator relevante ao desenvolvimento de doença por esse fungo e que também foi avaliado no presente estudo. Os resultados apresentados sugerem que o estudo funcional por ensaios de opsonofagocitose podem trazer melhor compreensão da interação dos fatores aqui relatados.

VI. CONCLUSÕES

Através do presente estudo, pode-se concluir que:

1. Houve um predomínio de neurocriptococose na população masculina HIV negativa.
2. A detecção de antígeno GXM capsular circulante nas amostras de soro de todos os pacientes com doença sintomática e em dois indivíduos assintomáticos com alta exposição ao *Cryptococcus* SP e a presença de altas densidades ópticas de IgG anti-GXM em ambos grupos sugerem que a produção de anticorpos não foi determinante para proteger da infecção pelo *Cryptococcus* sp., nem para o “clearance” de GXM circulante em indivíduos com neurocriptococose.
3. Pacientes que desenvolveram graves sequelas ou foram a óbito em decorrência da infecção mostraram baixos valores ou valores indetectáveis da via alternativa do sistema complemento demonstrando o papel desta via na resposta imediata à instalação da levedura no organismo ou um consumo destas proteínas decorrente da infecção pelo *Cryptococcus*.

4. O predomínio de altas concentrações de MBL sérica encontrado em pacientes com neurocriptococose sugere que valores elevados desta proteína podem facilitar a infecção por patógenos intracelulares como o *Cryptococcus*.
5. Estudos longitudinais que avaliam a opsonofagocitose do *Cryptococcus* podem auxiliar na compreensão do papel dos anticorpos e do sistema complemento na infecção do sistema nervoso por este fungo.

VII. ANEXOS

Anexo A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica e Experimental (LIM 56) da Faculdade de Medicina da USP, juntamente com o serviço do Hospital Emílio Ribas, está desenvolvendo uma pesquisa para melhor compreender a função do Sistema Imunológico em indivíduos com infecção pelo *C.neoformans*. Para este estudo é necessária a coleta de 10 mL de sangue de pacientes com criptococose e que sejam HIV negativos, como também, de indivíduos saudáveis expostos ao fungo, para a realização de exames laboratoriais específicos.

Você não tem obrigação alguma de contribuir para este estudo e sua recusa não ocasionará nenhum prejuízo para seu tratamento médico. Caso você concorde em participar desta pesquisa, serão coletados 10 mL de sangue de seu braço. Como em qualquer coleta de sangue pode haver desconforto local, sendo que, todas as medidas de segurança serão tomadas para minimizar, ao máximo, qualquer incômodo ou risco. Sempre que possível esta coleta será realizada junto com os exames de rotina para evitar coletas extras.

Este estudo não prevê benefícios diretos para você. Caso alguma informação obtida a partir da pesquisa possa lhe ser útil, faremos o possível para repassá-la, o mais rápido possível, para sua equipe médica. Em nenhum momento seu nome será divulgado em publicações, relatórios ou quaisquer outros meios de comunicação. Sua identidade será mantida em absoluto sigilo.

Após a leitura do texto acima, declaro que entendi todas as condições do estudo e concordo com todas elas.

Em caso de qualquer dúvida, favor contatar Dra Anete S. Grumach no telefone 3066-7499 em horário comercial.

NOME _____

ASSINATURA _____

TESTEMUNHA 1 _____

TESTEMUNHA 2 _____

DATA _____/_____/_____

Anexo B- Questionário

Avaliação do sistema complemento e produção de anticorpos de pacientes HIV negativos com neurocriptococose.**IDENTIFICAÇÃO****N**_____**DATA DA COLETA:** _____**GRUPO:** _____

Nome: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Etnia: _____

Sexo: _____

Cidade e Estado de nascimento: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade _____

UF: _____

Telefone: _____ Registro H.C.: _____

1. Você possui criação de aves em casa? Qual?

R: _____

2. No seu caminho diário você passa por criações de aves ou plantações de eucaliptos?

R: _____

3. Você costuma fazer eco-turismo? Em quais estados?

R: _____

4. Você trabalha em laboratórios, hospitais ou com criação de aves?

R: _____

5. Você tem alguma doença congênita ou algum problema de saúde?

R: _____

6. Você já precisou de transfusão sanguínea ou transplante de órgãos?

R: _____

7. Você já ficou internado ou precisou fazer alguma cirurgia?

8. Você usa alguma medicação todos os dias? Qual?

9. Você tem o hábito de tomar bebidas alcoólicas ou tabagismo?

R: _____

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Imunidade inata. In: Elsevier, editora. *Imunologia Celular e Molecular*. 5a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p.283-305.

Batista L, Silva MV. Criptococose. In: Veronesi R, editor. *Doenças infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991. p.661-3.

Bing DH, Alper CA. Complement in health and disease. In: Colvin RB, Bhan AK, McCluskey RT, editores. *Diagnostic immunopathology*. 3a ed. New York: Raven Press, 1995. p.85-94.

Blumer SO, Kaufman L. Characterization of immunoglobulin classes of human antibodies to *Cryptococcus neoformans*. *Mycopath*. 1977; 61:55-60.

Bogaerts J, Rouvroy D, Taelman H, Kagame A, Aziz MA, Swinne D, Verhaegen J. AIDS-associated cryptococcal meningitis in Rwanda (1983-1992): epidemiologic and diagnostic features. *J Infect*. 1999; 39:32-7.

Botha RJP, Wessels E. Cryptococcal meningitis in an HIV negative patient with systemic sarcoidosis. *J Clin Pathol*. 1999; 52:928-30.

Brandt S, Thorkildson P, Kozel TR. Monoclonal antibodies reactive with immunorecessive epitopes of glucuroxylomannan, the major capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003; 10:903-9.

Brummer E, Stevens DA. Antycryptococcal activity of macrophages: role of mouse strain, C5, contact, phagocytosis and L-arginine. *Cell Immunol.* 1994; 157:1-10.

Brummer E. Human defenses against *Cryptococcus neoformans*: an update. *Mycopathologia.* 1999; 1453:121-25.

Casadevall A, Perfect JR. Introduction to the pathogen. In: Casadevall A, Perfect JR, editores. *Cryptococcus neoformans*. Washington: American Society for Microbiology; 1998. p.1-27.

Casadevall, A, Feldmesser M, Pirofski, L. Induced humoral immunity and vaccination against major human fungal pathogens. *Cur Opin Microbiol.* 2002; 5:386-91.

Chang YC, Kwon-Chung KJ. Isolation of the third capsule-associated gene, cap 60 required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 1998; 66(5):2230-6.

Chen G, McNamara DA, Hernandez Y, Huffnagle GB, Toews GB, Olszewski MA. Inheritance of immune polarization patterns is linked to resistance versus susceptibility to *Cryptococcus neoformans* in a mouse model. *Infect Immun* 2008; 76:2379-91.

Cheng PY, Sham A, Kronstad JW. *Cryptococcus gattii* isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 2009; 77:4284-94.

Cherniak R, Reiss E, Slodki ME, Plattner RD, Blumer SO. Structure and antigenic activity of the capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* serotype A. *Mol Immunol* 1980; 17:1025-32.

Crissey JT, Lang H, Parish LC. Diseases caused by yeasts. In: Crissey JT, Lang H, Parish LC, editors. *Manual of medical mycology*. Blackwell Science; 1995. p. 83-114.

Datta K, Lees A, Pirofski L. Therapeutic efficacy of a conjugate vaccine containing a peptide mimotope of cryptococcal capsular polysaccharide glucuronoxylomannan. *Clin Vac Immunol* 2008; 15:1176-87.

DeShaw M, Pirofski LA. Antibodies to the *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan are ubiquitous in serum from HIV + and HIV – individuals. *Clin Exp Immunol*. 1995; 99:425-32.

Diamond RD, May JE, Kane A, Frank MM, Bennet E. The role of the classical and alternative complement pathway in host defenses against *Cryptococcus neoformans* infection. *J Immunol*. 1974; 112(6):2260-70.

Dong ZM, Murphy JW. Criptococcal polysaccharides bind to CD-18 on human neutrophils. *Infect Immun*. 1997; 65:557-63.

Drouhet E. Milestones in the history of *Cryptococcus* and cryptococcosis. *J Mycol Med*. 1997; 7:10-27.

Duppont B, Graybill JR, Armstrong D, Laroche R, Touzé JE, Wheat LJ. Fungal infections in AIDS patients. *J Med Vet Mycol*. 1992; 30:19-28.

Eisen DP, Minchinton RM. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infections diseases. *Clin Infect Dis*. 2003; 37:1496-505.

Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, *J Clin Microbiol*. 1990; 28(7):1642-4.

Fernandes OFL, Costa TR, Costa MR, Soares AJ, Pereira AJSC, Silva MRR. *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com AIDS. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000; 33(1):75-8.

Figueroa JE, Densen P. Infectious diseases associated with complement deficiencies. *Clin Microbiol Rev*. 1991; 4:359-95.

Frederiksen PD, Thiel S, Jensen L, Hansen AG, Matthiesen F, Jensenius JC. Quantification of mannan-binding lectin. *J Immunol Methods*. 2006; 315:49-60.

Fujita T, Matsushita M, Endo Y. The lectin-complement pathway- its role in innate immunity and evolution. *Immunol Rev*. 2004; 198:185-02.

Garred P, Richter C, Andersen AB, Madsen HO, Mtoni I, Svejgaard A, Shhao J. Mannan-binding lectin in the sub-saharan HIV and tuberculosis epidemics. *Scand J Immunol*. 1997; 46:204-8.

Goldman DL, Khine H, Abadi J, Lindenberg DF, Pirofski L, Niang R, Casadevall A. Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. *Pediatrics*. 2001; 107:1-6.

Graybill JR. Cell mediated immunity in *Cryptococcus* . *Cell Immunol*. 1974; 14:12-21.

Grinsell M, Weinhold LC, Cutler JE, Han Y, Kozel TR. In vivo clearance of glucuronoxylomannan, the major capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans*: a critical role for tissue macrophages. *J Infect Dis*. 2001; 184:479-87.

Guillot L., Carroll SF, Homer R; Qureshi ST. Enhanced innate immune responsiveness to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection is associated with resistance to progressive infection. *Infect Immun.* 2008; 76: 4745-56.

Harrison TS. *Cryptococcus neoformans* and cryptococcosis. *J. Infect.* 2000; 41:12-17.

Helou S, Robles, AM, Arechavala A, Bianchi MI, Negroni R. Cryptococcosis respiratória em pacientes HIV positivos. *Rev Iberoam Micol.* 1999; 16:126-9.

Holmskov U, Malhotra R, Sim RB, Jensenius JC. Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. *Immunol Today.* 1994; 15:67-74.

Houpt DC, Pfrommer GST, Young BJ, Larson TA, Kozel TR. Occurrences, immunoglobulin classes, and biological activities of antibodies in normal human serum that are reactive with *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan. *Infect Immun.* 1994; 62:2857-64.

Huang C, Levitz SM. Stimulation of Macrophage Inflammatory Protein-1 α , Macrophage Inflammatory Protein-1 β and RANTES by *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* in peripheral blood mononuclear cells from person with and without human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis.* 2000; 181:791-4.

Huffnagle GB, Strieter RM, McNeil LK, McDonald RA, Burdick MD, Kunkel SL, Toews GB. Macrophage inflammatory protein-1 α required for the effluent phase of pulmonary cell- mediated immunity to *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol*. 1997; 159: 318-27.

Jain AV, Zhang Y, Fields WB, McNamara DA, Choe MY, Chen G, Erb-Downward J, Osterholzer JJ, Toews GB, Huffnagle GB, Olszewski MA. Th2 but not TH1 immune bias results in altered lung functions in a murine model of pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *Infect Immun*. 2009; 77: 5389-99.

Jain N, Guerrero A, Fries BC. Phenotypic switching and its implications for the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res*. 2006; 6:480-8.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik, M. Imunidade inata. In: Janeway CA, editor. *Imunobiologia*. 5a ed. Porto Alegre: Artmed; 2002. p.55-111.

Jensenius JC. MBP and innate immunity [Letter]. *Science*. 1995; 270:1104.

Joiner KA, Hawuger A, Gelfand JA. A study of optimal reaction conditions for an assay of the human alternative complement pathway. *Am J Clin Pathol*. 1983;79:65-72.

Kawakami K, Qureshi MH, Zhang T, Koguchi Y, Xie Q, Kurimoto M, Saito A. Interleukin-4 weakens host resistance to pulmonary and disseminated cryptococcal infection caused by combined treatment with Interferon- γ inducing cytokines. *Cell Immunol.* 1999;197:55-61.

Khanna N, Chandramuki A, Desari A, Ravi V. Cryptococcal infections of the central nervous system: an analysis of predisposing factors, laboratory findings and outcome in patients from South India with special reference to HIV infection. *J Med Microbial.* 1996; 45:376-9.

Knoke M, Schwesinger G. One hundred years ago: the history of cryptococcosis in Greifswald. Medical mycology in the nineteenth century. *Mycoses.* 1994; 37:229-33.

Kozel TR, deJong BCH, Grinsell MM, MacGill RS, Wall KK. Characterization of anticapsular monoclonal antibodies that regulate activation of the complement system by the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Infect Immun.* 1998; 66:1538-46

Kozel TR, Gotschlich EC. The capsule of *Cryptococcus neoformans* passively inhibits phagocytosis of the yeast by macrophages. *J Immunol.* 1982; 129(4):1657-80.

Kozel TR, Levitz SM, Dromer F, Gates MA, Thorkildson P, Janbon G. Antigenic and biological characteristics of mutant strains of *Cryptococcus neoformans* lacking capsular acetylation or xylosyl side chains. *Infect Immun.* 2003;71(5):2868-75.

Kozel TR. Activation of the complement system by pathogenic fungi. *Clin Microbiol Rev.* 1996; 9:34-46.

Kwon KW, Lendvai, N.; Morrison, S.; Trinh, K.R.; Casadevall, A. Biological activity of a mouse human chimeric immunoglobulin G2 antibody to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9:201-4.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Cryptococcosis. In: Kwon-Chung KJ, Bennett JE, editores. *Medical Mycology*. Philadelphia: Lea e Febiger; 1992. p.397-446.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Criptococose. In: Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT, editores. *Tratado de Micologia Médica*. São Paulo: Sarvier; 2002. p.416-440.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. Criptococose. In: Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, editores. *Micologia médica*. 7a ed. São Paulo: Sarvier; 1984. p.225-233.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. Criptococose. In: Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, editores. *Micologia Médica*. São Paulo: Sarvier; 1991. p.307-319.

Lamura L, Mattheus RC, Barchiesi F, Donahoe M, Burnie JP, Scalise G. Analysis of antibody response to *Cryptococcus neoformans* in five patients with AIDS and cryptococcosis by immunoblotting. *J. Infect.* 2000;40:64-8.

Lee SC, Kress Y, Khao M, Dickson DW, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* survive and replicate in human microglia. *Lab Invest.* 1995;73(6):871-9.

Levitz SM, Nong S, Seetoo KF, Harrison TS, Speizer RA, Simons ER. *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. *Infect Immun.* 1999; 67(2):885-90.

Lima LAA. Criptococose. In: Schechter M, Marangoni DV, editores. *Doenças Infecciosas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p.631-3.

Lin X, Heitman J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu.Rev.Microbiol.* 2006; 60:69-105.

Lipovsky MM, Elden LJR, Walenkarup AME, Dankert J, Hoepelman AIM. Does the capsule component of the *C.neoformans* glucuroxylomannan impair transendothelial migration of leucocytes in patients with cryptococcal meningitis? *J Infect Dis.* 1998; 178: 1231-2.

MacGill TC, MacGill RS, Kozel TR. Capsular reactions of *Cryptococcus neoformans* with polyspecific and oligospecific polyclonal anticapsular antibodies. *Infect Immun.* 2001; 69:1189-91.

Marcher AM, Bennett JE, Gadez JE, Frank MM. Complement depletion in cryptococcal sepsis. *J Immunol.* 1978;120(5):1686-90.

Martinez LR, Christaki E, Casadevall A. Specific antibody to *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan antagonizes antifungal drug action against cryptococcal biofilms *in vitro*. *J Infect Dis.* 2006, 194:261-6

Martinez LR, Moussai D, Casadevall A. Antibody to *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomann inhibits the release of capsular antigen. *Infect Immun.* 2004; 72:3674-9.

McDonnell JM, Hutchins GM. Pulmonary cryptococcosis. *Hum Patol.* 1985; 16(2):121-8.

McFadden DC, De Jesus M, Casadevall A. The physical properties of the capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* suggest features for capsule construction. *J Biol Chem.* 2006; 281:1868-75.

Mershon KL, Vasuthasawat A, Lawson GW, Morrison SL, Beenhouwer DO Role of complement in protection against *Cryptococcus gattii* infection. *Infect Immun*, 2009; 77:1061-70.

Miller FM, Mitchell TG, Storku WJ, Dawson JR Human natural killer cell do not inhibit growth of *Cryptococcus neoformans* in the absence of antibody. *Infect Immun.* 1990; 58: 639-45.

Mitchell DH, Sorrell TC, Allworth AM, Heath CH, McGregor AR, Papanou K, Richards MJ, Gottlieb T. Cryptococcal disease of the CNS in immunocompetent hosts: influence of cryptococcal variety on clinical manifestations and outcome. *Clin Infect Dis.* 1995; 20:611-6.

Mitchell TG. Micologia Médica. In: Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA, editores. *Microbiologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p. 486-8.

Moretti ML, Resende MR, Lazéra MS, Colombo AL, Shikanai-Yasuda MA. Consenso em criptococose-2008. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008; 41:524-44.

Murphy JW. Immunological down-regulation of host defenses in fungal infections. *Mycoses.* 1999; 42(suppl-2):37-42.

Netski D, Kozel TR. Fc-dependent and Fc-independent opsonization of *Cryptococcus neoformans* by anticapsular monoclonal antibodies: Importance of epitope specificity. *Infect Immun.* 2002; 70:2812-9.

Núñez MJ, Lis JM, Rodríguez JR, Allegue MJ, Viladeich A, Conde C, Santiago MP, Amigo MC. Criptococosis encefálica diseminada como forma de presentación de una linfocitopenia T-CD4 idiopática. *Rev Neurol*. 1999; 28(4):390-3.

Osterholzer JJ, Milam JE, Chen GH, Toews GB, Huffnagle GB, Olszewski MA. Role of dendritic cells and alveolar macrophages in regulating early host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 2009; 77:3749-58.

Pietrella D, Fries B, Lupo P, Bistoni F, Casadevall A, Vecchiarelli A. Phenotypic switching of *Cryptococcus neoformans* can influence the outcome of the human immune response. *Cel. Microbiol*. 2003; 5:513-22.

Polotsky VY, Belisle, JT, Mikusova K, Ezekowitz AB, Joiner KA. Interaction of human mannose-binding protein with mycobacterium avium. *J Infect Dis*. 1997; 5:159-68.

Powderly WG. Cryptococcal meningitis and AIDS. *Clin Infect Dis*. 1993;17:837-42.

Price MS, Betancourt-Quiroz M, Price JL, Toffaletti DL, Vora H, Hu G, Kronstad JW, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans* requires a functional glycolytic pathway for disease but not persistence in the host. *Mbio*. 2011; 2:1-10.

Ramirez JA, Srinath L, Ahkee S, Huang AK, Raff MJ. HIV-negative “AIDS” in Kentucky: a case of idiopathic CD4+ lymphopenia and cryptococcal meningitis. *South Med J*. 1994; 87(7):751-3.

Rippon JW. Cryptococcosis. In: Rippon JW, editor. *Medical Mycology*. 2a ed. Estados Unidos: Saunders; 1982. p.532-58.

Rocha KC. *Avaliação da fenotipagem leucocitária e da resposta linfoproliferativa de pacientes HIV soronegativos com neurocriptococose*. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2006.

Rodrigues ML, Travassos LR, Miranda KR, Franzen AJ, Rozental S, Souza W, Alviano CS, Barreto-Bergter E. Human antibodies against a purified glucosylceramide from *Cryptococcus neoformans* inhibit cell budding and fungal growth. *Infect Immun*. 2000; 68:7049-60.

Rosas AL, MacGill RS, Nosanchuk JD, Kozel TR, Casadevall A. Activation of the alternative complement pathway by fungal melanins. *Clin Diagn Lab*. 2002; 9:144-8.

Saag MS, Graybill RJ, Larsen RA, Pappas PG, Perfect JR, Powderly WG, Sobel JD, Dismukes WE. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. *Clin Infect Dis*. 2000; 30:710-8.

Saha DC, Xess I, Jain N. Evaluation of conventional & serological methods for rapid diagnosis of cryptococcosis. *Indian J Med Res.* 2008; 127: 483-8.

Schop J. Protective immunity against *Cryptococcus neoformans* infection. *M J M.* 2007; 10:35-43.

Sidrim JJC. Micoses Oportunistas. In: Sidrim JJC, Moreira JLB, editores. *Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p.171-90.

Speed BR, Kaldor J, Cairns B, Pegorer M. Serum antibody response to active infection with *Cryptococcus neoformans* and its varieties in immunocompetent hosts. *J Med Vet Mycol.* 1996; 34:187-93.

Speth C, Rambach G, Lass-Flörl C, Dierich MP, Würzner R. The role of complement in invasive fungal infections. *Mycoses.* 2004; 47:93-103.

Spoljar BH, Tomasié J. A novel ELISA for determination of polysaccharide specific immunoglobulins. *Vaccine.* 2001; 19:924-30.

Sumiya M, Super M, Tabona P, Levinsky RJ, Arai T, Turner M, Summerfield JA. Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children, *Lancet.* 1991; 337:1569-70.

Taborda CP, Casadevall A. CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) are involved in Complement-Independent antibody-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Immunity*. 2002; 16:791-802.

Thiel S, Holmskov U, Hviid L, Laursen SB, Jensenius JC. The concentration of the C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during an acute phase response. *Clin Exp Immunol*. 1992; 90:31-5.

Traynor TR, Kuziel WA, Toews GB, Huffnagle GB. CCR2 expression determines T1 versus T2 polarization during pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *J Immun*. 2000; 164: 2021-7.

Truelsen K, Young T, Kozel TR. *In vivo* complement activation and binding of C3 to encapsulated *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 1992; 60(9):3937-9.

Van der Wetering JK, Coenjaerts FE, Vaandrager AB, van Golde LM, Batenburg JJ. Agregation of *Cryptococcus neoformans* by surfactant protein D is inhibited by its capsular component glucuronoxylomannan. *Infect Immun*. 2004; 72 (1):145-53.

Vecchiarelli A, Dottorini M, Pietrella D, Monari C, Retini C, Todisco T, Bistoni F. Role of human alveolar macrophages as antigen-presenting cells in *Cryptococcus neoformans* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994; 11:130-7.

Vecchiarelli A, Retini C, Casadevall A, Monari C, Pietrella D, Kozel TR. Involvement of C3a e C5a in interleukin-8 secretion by human polymorphonuclear cells in response to capsular material of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 1998; 66(9):4324-30.

Vecchiarelli A, Retini C, Pietrella D, Monari C, Kozel TR. T lymphocyte and monocyte interaction by CD40/CD40 ligand facilitates a lymphoproliferative response and killing of *Cryptococcus neoformans* *in vitro*. *Eur J Immunol*. 2000; 30:1385-93.

Voelz K, May RC. Cryptococcal interactions with the host immune system. *Eukaryotic Cell*. 2010; 9:835-46.

Waage NE, Thidemann JH, Hadasen K, Wullemmin W, Hack CE, Mollnes TE. Activation of complement, coagulation, fibrinolytic and kallikrein-kinin systems during of hereditary angioedema. *Scand J Immunol*. 1996; 44:185-92.

Washburn RG, Bryant-Varela BJ, Julian NC, Bennett JE. Differences in *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide structure influence assembly of alternative complement pathway C3 convertase on fungal surfaces. *Mol Immunol*. 1991; 28:465-70.

Wilson MA, Kozel TR. Contribution of antibody in normal human serum to early deposition of C3 onto encapsulated and nonencapsulated *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 1992; 60(3):754-61.

Wuang J, Aisen P, Casadevall A. Melanin, melanin “ghosts” and melanin composition in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 1996;64(7):2420-4.

Zaragoza O, Rodrigues ML, De Jesus M, Frases S, Dadachova E, Casadevall A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol*. 2009; 68: 133-216.

Zhong Z, Pirofski L. Opsonization of *Cryptococcus neoformans* by human anticryptococcal glucuronoxylomannan antibodies. *Infect Immun*. 1996; 64:3446-50.

Há quem diga que todas as noites são de sonho, mas há também quem garanta que nem todas são as de verão. No fundo, isso não tem importância, o que interessa mesmo não é a noite em si e sim os sonhos que o homem sonha sempre, em todos os lugares, em todas as épocas do ano, dormindo ou acordado.

W.Shakespeare