

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização molecular, virulência e suscetibilidade ao fluconazol de
espécies ambientais de *Cryptococcus*, antes e após inoculação em
modelo murino

REGINALDO DOS SANTOS PEDROSO

Ribeirão Preto

2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização molecular, virulência e suscetibilidade ao fluconazol de espécies ambientais de *Cryptococcus*, antes e após inoculação em modelo murino

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Biociências Aplicadas à Farmácia.

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientado: Reginaldo dos Santos Pedroso

Orientadora: Profa.Dra. Regina Celia Candido

Co-orientadora: Profa.Dra. Claudia M. Leite Maffei

Ribeirão Preto

2008

RESUMO

PEDROSO, R.S. **Caracterização molecular, virulência e suscetibilidade ao fluconazol de espécies ambientais de *Cryptococcus*, antes e após inoculação em modelo murino.** 2008. 133f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Cryptococcus neoformans e *C. gattii* são as principais espécies do gênero que causam infecção no homem, *C. albidus* e *C. laurentii* são espécies menos envolvidas. O presente trabalho teve por objetivos avaliar a patogenicidade *in vivo*, os fatores e os genes relacionados à virulência, e verificar o perfil de suscetibilidade ao fluconazol de 10 isolados ambientais de cada uma das espécies: *C. neoformans*, *C. albidus* e *C. laurentii*, antes e após a inoculação em camundongos BALB/c imunocompetentes; pesquisar os sorotipos, *mating types* e realizar a tipagem molecular. Proteinase, fosfolipase, urease, produção de melanina e crescimento à 37°C foram pesquisados utilizando metodologias clássicas, e a pesquisa dos genes e determinação dos sorotipos e *mating types* foram feitas por PCR. A tipagem molecular foi realizada por PCR-*fingerprinting*, com os iniciadores (GACA)₄ e M13. A determinação da CIM do fluconazol foi realizada pelo método da microdiluição em caldo. Todos os isolados de *C. neoformans* foram sorotipos A e MATa. A inoculação em animais mostrou que 9 isolados de *C. neoformans* mataram 100% deles em até 33 dias, e 1 levou os animais à morte num período entre 40 e 82 dias; 9 isolados foram recuperados dos pulmões e cérebro dos animais em 7 e 14 dias, e um deles levou todos os animais à morte em 12 dias, sendo possível recuperá-lo somente no 7º dia. Os animais inoculados com *C. albidus* e *C. laurentii* permaneceram vivos até negatificação das culturas dos órgãos avaliados. *C. albidus* foi isolado principalmente do fígado e dos pulmões até 10 dias após a inoculação, *C. laurentii* dos pulmões e do cérebro até 120 dias. Todos os isolados das 3 espécies produziram cápsula antes e após a inoculação. Todos *C. neoformans*, 6 *C. albidus* e 6 *C. laurentii* cresceram à 37°C antes e depois da inoculação. Melanina foi produzida por todos os isolados de *C. neoformans* e nenhum *C. albidus* nas duas ocasiões; e por 6 e 9 isolados de *C. laurentii*, antes e depois da inoculação, respectivamente. Seis isolados de *C. neoformans* e 1 de *C. laurentii* produziram proteinase nas duas ocasiões. Sete isolados de *C. albidus* produziram proteinase antes e todos depois da inoculação. Fosfolipase foi produzida por todos *C. neoformans* e *C. albidus*, e por 6 *C. laurentii* nas duas ocasiões. A avaliação da atividade da urease realizada em meio líquido foi positiva em 24 a 48 horas pelos isolados de *C. neoformans* e *C. laurentii*, e em 24 a 96 horas por *C. albidus*. A CIM de fluconazol variou de 2 a 8 µg/mL para *C. neoformans*, de 8 a ≥ 64 µg/mL para *C. albidus*, e de 1 a 64 µg/mL para *C. laurentii*, nas duas ocasiões. Todos os isolados de *C. neoformans* apresentaram os genes lacase (*Lac1*), fosfolipase (*PLB1*), proteinase (*cnap1*), calcineurina (*CNA1*), urease (*URE1*), e *ERG11*, com os oligonucleotídeos utilizados. A PCR com *ERG11* mostrou uma banda no gel de agarose para todos *C. albidus*, porém nenhum dos outros genes pesquisados foram amplificados em *C. albidus* e *C. laurentii*. A tipagem molecular por PCR-*fingerprinting* dos isolados de *C. neoformans* revelou 2 tipos moleculares: VNI (7 isolados) e VNII (3 isolados). A maioria dos isolados de *C. albidus* apresentou homogeneidade nos padrões de bandas gerados, e *C. laurentii* foi a espécie que demonstrou maior diversidade genética por esta metodologia. Concluímos que a passagem dos isolados pelos animais não alterou os fenótipos estudados e nenhuma alteração foi detectada pela análise molecular. No entanto, verificamos a grande heterogeneidade molecular dos isolados de *C. laurentii* estudados.

Palavras-chave: *Cryptococcus* spp. Fatores de virulência. Patogenicidade. *Lac1*. *PLB1*. *cnap1*. *CNA1*. *URE1*. *ERG11*. Tipagem molecular.

ABSTRACT

PEDROSO, R.S. *Cryptococcus* environmental species: molecular characterization, virulence and susceptibility to fluconazole before and after inoculation in a murine model. 2008. 133p. Thesis (Doctorate) Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of S. Paulo.

Species of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* are the main ones in the genus causing infection in man while *C. albidus* and *C. laurentii* are less involved. This study evaluated the *in vivo* pathogenicity, factors and genes related to virulence and the susceptibility to fluconazole before and after inoculation in immunocompetent BALB/c mice of ten environmental isolates of *C. neoformans*, *C. albidus* and *C. laurentii*. Serotypes, mating types and molecular typing were also determined to complete the evaluation. Enzymes like proteinases, phospholipase, urease, production of melanin and growth at 37°C were investigated by classical methods, but gene characterization and determination of serotypes and mating types were investigated by PCR. Molecular typing was done by PCR-fingerprinting with primers (GACA)₄ and M13. The microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of fluconazole. All *C. neoformans* isolates were serotype A and MAT/α and 9 of them when inoculated in animals killed 100% in up to 33 days. One isolate inoculated killed the animals in 40 to 82 days. Nine isolates were recovered from the animal lungs and brain in 7 and 14 days and the one which killed all animals in 12 days was only recovered on the 7th day. Animals inoculated with *C. albidus* and *C. laurentii* were alive until the tissue cultures of evaluated organs were negative. *C. albidus* was isolated mainly from the liver and lungs in up to 10 days after inoculation and strains of *C. laurentii* from the lungs and brain in up to 120 days. All isolates in the 3 species were capsule producers before and after inoculation. All strains of *C. neoformans*, 6 *C. albidus* and 6 *C. laurentii* grew at 37°C both before and after inoculation. All *C. neoformans* produced melanin and 6 *C. laurentii* produced it before inoculation and nine after. None was produced by *C. albidus*. Six isolates of *C. neoformans* and one of *C. laurentii* produced proteinases in both situations, before and after inoculation. Seven *C. albidus* isolates produced the protein hydrolyzing enzyme before inoculation and all after. Phospholipase enzyme was produced by all *C. neoformans*, and *C. albidus* and by 6 *C. laurentii* in both conditions, before and after inoculation. Urease activity was detected between 24 and 48 hours after incubation in a liquid medium for *C. neoformans* and *C. laurentii* cultures and after 24 to 96 hours for *C. albidus*. Fluconazole MICs ranged from 2 to 8 µg/mL for *C. neoformans* isolates, from 8 to ≥ 64 µg/mL for *C. albidus* and from 1 to 64 µg/mL for *C. laurentii* in both conditions. Genes laccase (*Lac1*), phospholipase (*PLB1*) proteinase (*cnap1*), calcineurine (*CNA1*), urease (*URE1*) and *ERG11*, detected with the primers used were present in all *C. neoformans*. With exception of *ERG11*, which showed a band in agarose electrophoresis by all *C. albidus*, the other genes were not amplified in *C. albidus* and *C. laurentii*. Molecular typing by PCR-fingerprinting showed two molecular types in *C. neoformans*: VNI in 7 isolates and VNII in 3 isolates. Most *C. albidus* showed homogenous patterns in the bands generated and *C. laurentii* was the species with the higher genetic diversity by this methodology. It is concluded that isolate inoculations in animals does not alter phenotypes and no alteration is detected by molecular analysis. However, the high molecular heterogeneity of *C. laurentii* was detected.

Keywords: *Cryptococcus* spp. Virulence factors. Pathogenicity. *Lac1*. *PLB1*. *cnap1*. *CNA1*. *URE1*. *ERG11*. Molecular typing.

1 – INTRODUÇÃO

As leveduras do gênero *Cryptococcus* apresentam ampla distribuição na natureza, e podem ser isoladas de diversas fontes, como ar, solo, excretas de aves, água, superfície e mucosas de animais, folhas, flores e madeira em decomposição, e nas mais diversas regiões, como Caribe, Himalaia e Antártica (FELL; STATZELL-TALLMAN, 1998; KHAWCHAROENPORN; APISARNTHANARAK; MUNDI, 2007; KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). A maioria é considerada de vida livre e poucas espécies apresentam importância em micologia médica. As duas principais espécies que causam doença no homem e em animais são *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, sendo a primeira o agente de criptococose principalmente em indivíduos imunocomprometidos, como aqueles que apresentam AIDS. *C. gattii* é agente de criptococose geralmente em indivíduos imunocompetentes (BICANIC; HARRISON, 2005; LEVITZ; BOEKHOUT, 2006).

As outras espécies do gênero geralmente são consideradas saprófitas, no entanto, nos últimos quarenta anos, a incidência de infecções por estes organismos tem aumentado, sendo que aquelas causadas por *Cryptococcus albidus* e *Cryptococcus laurentii* juntas são responsáveis por 80% dos casos relatados de criptococose não-*neoformans* e não-*gattii*. Outras espécies isoladas de material clínico, consideradas de menor importância, são *Cryptococcus uniguttulatus*, *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus adeliensis*, *Cryptococcus humiculus*, *Cryptococcus luteolus* e *Cryptococcus macerans* (JOHNSON; BRADLEY; KAUFFMAN, 1998; KHAWCHAROENPORN; APISARNTHANARAK; MUNDI, 2007).

A maioria dos indivíduos acometidos por criptococose apresenta algum tipo de imunossupressão, geralmente envolvendo a imunidade celular, como a que ocorre nos infectados pelo vírus HIV, nos neutropênicos, e naqueles que recebem terapia prolongada com corticosteróides (BICANIC; HARRISON, 2005; JOHNSON; BRADLEY; KAUFFMAN, 1998; McCURDY; MORROW, 2001).

1.1 – *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*

C. neoformans e *C. gattii* são basidiomicetos, e na fase assexuada apresentam células arredondadas, ocasionalmente ovóides, isoladas ou com brotamento, envolvidas por cápsula mucopolissacarídica. *C. neoformans* é a fase anamórfica de *Filobasidiella neoformans* e *C. gattii* é a fase anamórfica de *F. bacillispora*. Estas duas espécies formavam duas variedades de *C. neoformans*, var. *neoformans*, sorotipos A e D, e var. *gattii*, sorotipos B e C (KWON-

CHUNG; BENNETT, 1992). Franzot, Salkin e Casadevall (1999) propuseram a inclusão do sorotipo A em uma nova variedade, var. *grubii*, baseando-se em estudos que envolveram a análise das diferenças genóticas entre os sorotipos A e D. A partir de 2002, avanços na compreensão da estrutura genética de *C. neoformans*, permitiram a inclusão dos sorotipos B e C em uma nova espécie, *C. gattii* (KWON-CHUNG; VARMA, 2006). Assim, atualmente *C. neoformans* compreende a variedade *grubii*, sorotipo A, variedade *neoformans*, sorotipo D, e o híbrido AD, e a espécie *C. gattii* inclui os sorotipos B e C.

As colônias de *C. neoformans* e *C. gattii*, em ágar Sabouraud dextrose, incubadas durante sete dias a 25°C, são brancas, beges ou cremes, geralmente mucóides e brilhantes, devido à presença de cápsula, que é evidenciada quando são feitas preparações com tinta nanquim. Em meios contendo compostos fenólicos desenvolvem uma coloração que vai de marrom a preta, dependendo do substrato, que é oxidado para formar melanina, num processo enzimático complexo, mediado pela enzima lacase. A micromorfologia, em ágar fubá-tween 80, mostra estruturas arredondadas, com brotamento geralmente único e ausência de hifas e pseudo-hifas (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

A diferenciação entre as duas espécies é feita explorando algumas diferenças bioquímicas. *C. gattii* assimila ácido málico, fumárico e succínico, utiliza glicina como fonte de carbono, enquanto *C. neoformans* não apresenta essas características. *C. neoformans* é também sensível a concentrações superiores a 1,6 µg/mL de cicloheximida. A capacidade de *C. gattii* utilizar a glicina e crescer na presença de L-canavanina é freqüentemente utilizada na diferenciação destas espécies no laboratório de micologia, em que é utilizado o meio CGB (canavanina glicina azul de bromotimol). *C. neoformans* não metaboliza a glicina e nem cresce na presença de L-canavanina, permanecendo o meio inerte, enquanto o crescimento de *C. gattii* leva à mudança do pH do meio, e à alteração da cor verde para azul (CASADEVALL; PERFECT, 1998).

As diferenças genéticas entre as duas espécies e entre diferentes isolados, tanto clínicos quanto ambientais, têm sido detectadas por métodos de tipagem molecular, como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism), RAPD (Random Amplified Polimorfism DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorfism) e PCR-*Fingerprinting*. As técnicas baseadas em PCR vem se tornando um boa alternativa, mostrando-se mais sensíveis, específicas e rápidas, sofrendo menos influência de fatores externos do que os métodos tradicionais baseados em aspectos fenotípicos, e são uma importante ferramenta no estudo da epidemiologia de isolados de espécies de *Cryptococcus* (MEYER et al., 1993).

A tipagem molecular foi originalmente realizada utilizando experimentos de hibridização de DNA-*fingerprinting* clássicos para detectar seqüências de DNA minissatélites e microssatélites. Posteriormente, os oligonucleotídeos que eram utilizados passaram a ser os *primers* únicos em PCRs para detectar fragmentos de DNA hipervariáveis no genoma de *C. neoformans* e espécies relacionadas. Os mais utilizados são iniciadores que detectam seqüências minissatélites, como a seqüência do core do fago M13, e seqüências microssatélites, como (GTG)₅, e (GACA)₄. Os perfis eletroforéticos resultantes da amplificação com estes *primers* são altamente reprodutíveis e mostram variações entre espécies, variedades e entre indivíduos de uma mesma espécie (MEYER et al., 1993).

Estas técnicas moleculares de tipagem têm permitido agrupar os isolados de *C. neoformans* e de *C. gattii* em 8 tipos moleculares: VN I (var. *grubii*, sorotipo A), VN II (var. *grubii*, sorotipo A), VN III (sorotipo AD), VN IV (var. *neoformans*, sorotipo D), VG I, VG II, VG III, e VG IV (*C. gattii*, sorotipos B e C). Nenhuma correlação entre sorotipo e tipo molecular foi encontrada em *C. gattii*. Os genotipos VN I e VG I predominam no mundo todo, enquanto que em pacientes com AIDS, a maioria dos isolados são VN I e VN IV (MEYER et al., 2003).

C. neoformans é encontrado em todas as regiões do mundo, sendo que o sorotipo A predomina em isolamentos clínicos e ambientais na maioria das áreas, com exceção em países do Norte Europeu, onde o sorotipo D corresponde a 50% dos isolamentos (CASADEVALL; PERFECT, 1998). Essas diferenças geográficas na prevalência destes sorotipos têm sido relacionadas a diferenças na tolerância climática e na virulência do microrganismo (HORTA et al., 2005; KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; MARTINEZ; GARCIA-RIVERA; CASADEVALL, 2001).

A distribuição geográfica de *C. gattii* também apresenta variação conforme os sorotipos. Até pouco tempo acreditava-se estar restrita às áreas tropicais e subtropicais. Porém, um surto ocorrido em Vancouver Island, Canadá, relatado em 2002, mudou o conceito relacionado ao padrão de distribuição desta espécie (KIDD et al., 2004). A ecologia de *C. gattii* começou a ser compreendida quando o sorotipo B foi isolado de *Eucalyptus camaldulensis* e *E. tereticornis* na Austrália (ELLIS; PFEIFFER, 1990; PFEIFFER; ELLIS, 1991; 1992). Posteriormente, esta levedura foi isolada de insetos, fezes de morcegos, bem como de espécies de árvores em várias regiões do mundo (CÁRDENAS, 1998; GEZUELE et al., 1993; LAZERA; WANKE; NISHIKAWA, 1993; LAZERA et al., 2000). O sorotipo C é raramente encontrado, e foram relatados casos clínicos no Sul da Califórnia e isolamentos ambientais na Colômbia (CALLEJAS et al., 1998).

C. neoformans e *C. gattii* apresentam uma fase sexual conhecida, com dois *mating types*, *MAT α* e *MATa*. O *mating type* é definido pelo locus *MAT*, que dá a identidade sexual. Em *C. neoformans* e *C. gattii* este locus contém 20 genes. O produto do cruzamento sexual entre dois isolados de *mating type* opostos é o basidiósporo (CAMPBELL; CARTER, 2006). Os isolamentos clínicos e ambientais de *C. neoformans* e de *C. gattii* são, na sua maioria, do *MAT α* (KWON-CHUNG; EDMAN; WICKES, 1992; MITCHELL, 2003; OKABAYASHI et al., 2006).

A história natural da doença fúngica em geral está diretamente relacionada com a suscetibilidade do hospedeiro, pois é esta que geralmente determina a gravidade da infecção. As infecções sistêmicas, oportunistas ou não, ocorrem pela inalação de propágulos do microrganismo, que se depositam no alvéolo pulmonar. A disseminação pode ocorrer a outros sítios, provavelmente por via hematogênica, principalmente, em pessoas com comprometimento da imunidade celular, resultante de doenças imunossupressoras, como AIDS e patologias linfoproliferativas (SEGAL; BAUM, 1994).

De modo geral, o primeiro aspecto importante para a patogenicidade de *Cryptococcus* parece ser a sua aderência à superfície do hospedeiro, seguida pela colonização do tecido. *C. neoformans* é um patógeno intracelular facultativo, portanto, capaz de sobreviver em macrófagos e permanecer na vesícula ácida fagossômica, mantendo sua capacidade de multiplicação. Essa permanência intracelular parece ser um elemento importante na persistência da infecção, disseminação por via hematogênica e estabelecimento no sistema nervoso central. O mecanismo pelo qual *C. neoformans* evita a morte depois da ingestão por fagócitos permanece pouco compreendido, mas há evidência de que a sobrevivência intracelular pode ser dada pela produção de pigmentos melanóides (CASADEVALL, 2000; SANTANGELO et al., 2004).

A disseminação para o sistema nervoso central e subsequente desenvolvimento de meningite e encefalite, é a principal causa de mortalidade durante as infecções por *C. neoformans* e *C. gattii*. Os fatores de virulência do fungo parecem ter grande importância na invasão tecidual, manutenção, multiplicação e disseminação do microrganismo, e também na gravidade da doença (CASADEVALL, 2000; SALLAS et al., 1996; SANTANGELO et al., 2004; OLSZEWSKI et al., 2004). A entrada da levedura no sistema nervoso central pode ocorrer através do cruzamento direto dos pequenos capilares da barreira hematoencefálica, esse cruzamento pode ocorrer também por extravasamento direto, transcitose endotelial, ou o microrganismo pode cruzar essas barreiras no interior de fagócitos mononucleares, o que alguns pesquisadores têm chamado de cavalo de tróia. É possível que diferentes rotas levem a

levedura ao sistema nervoso central, e em cada caso, diferentes fatores de virulência do microrganismo estejam envolvidos (BARLUZZI et al., 2000; CASADEVALL, 2000; CHRETIEN et al., 2002; LEE; DICKSON; CASADEVALL, 1996; OLSZEWSKI et al., 2004; SALAS et al., 1996).

A principal e mais grave manifestação clínica da criptococose é a meningoencefalite, que geralmente ocorre em indivíduos imunocomprometidos, porém manifestações em outros sítios, como pulmões, ossos e articulações, vasos sanguíneos, próstata, fígado e tecido cutâneo, ocorrem com menos frequência (MITCHELL; PERFECT, 1995; PAPPALARDO; MELHEM, 2003).

C. neoformans var. *grubi* infecta primariamente indivíduos imunocomprometidos, e causa mais de 90% dos casos de criptococose, sendo que mais de 99% destes casos são em pacientes com AIDS. *C. neoformans* var. *neoformans*, também infecta pacientes imunocomprometidos, todavia em uma frequência menor, e são considerados menos virulentos (MITCHELL; PERFECT, 1995). O sorotipo AD foi isolado do ambiente e em pacientes na América do Norte e Europa, com manifestações clínicas similares às descritas (LENGELER; COX; HEITMAN, 2001).

As infecções por *C. gattii* ocorrem principalmente em regiões de clima temperado e tropical, especialmente em indivíduos imunocompetentes, sendo considerado um patógeno primário. As manifestações clínicas ocorrem no pulmão, região cutânea e principalmente no sistema nervoso central (LACAZ et al., 2002; MITCHELL; PERFECT, 1995; PAPPALARDO; MELHEM, 2003; SEVERO; BERTA-E-ZARDO; LONDERO, 2001).

A doença é mais frequente em adultos, porém ocorre também em crianças das mais variadas idades, como demonstraram Correa et al. (1999; 2002), em levantamentos realizados no Estado do Pará.

1.2 – *Cryptococcus laurentii*

C. laurentii é uma levedura que apresenta cápsula e células ovóides. É isolada do ambiente a partir de vegetais, excretas de aves, e nos mais diferentes ecossistemas. Ocasionalmente é isolada da pele humana como saprófita (FILION; KIDD; AGUIRRE, 2006; KURTZMAN; FELL, 1998; ROSARIO et al., 2005). O material fecal de aves sadias parece ser reservatório dessa espécie (MATTSSON; HAEMIG; OLSEN, 1999). Alguns isolados da Antártica mostraram-se psicrófilicos, criotolerantes, com temperatura ótima de crescimento de 15°C, sendo que não cresceram em temperaturas iguais ou maiores que 30°C. No entanto,

alguns isolados clínicos e ambientais crescem à temperatura de 37°C. Estes dados revelam a capacidade adaptativa a diversos ambiente, e a heterogeneidade da espécie (KURTZMAN; FELL, 1998; PAVLOVA et al., 2001).

A identificação laboratorial se baseia na realização de provas clássicas, como atividade de urease, assimilação de fontes de carbono e de nitrogênio. *C. laurentii* não fermenta açúcares (glicose e outros), e pode formar melanina nos meios contendo substratos fenólicos, geralmente colônias com pigmentação mais clara que a que ocorre com *C. neoformans* e *C. gattii*, e em um período de incubação mais prolongado (IKEDA et al., 2002; PEDROSO; FERREIRA; CANDIDO, 2007). Não utiliza nitrato, assimila melibiose e lactose, o que auxilia na diferenciação das espécies *C. neoformans* e *C. gattii*. As colônias em ágar Sabouraud dextrose, incubadas a 25°C, são lisas, brilhantes, com coloração variando de creme, amarela, rosa ou laranja, conforme o tempo de incubação. A micromorfologia revela células ovóides, blastoconídeos isolados, aos pares ou em pequenas cadeias, com cápsula visível em preparações com tinta nanquim (KURTZMAN; FELL, 1998).

A afinidade de *C. laurentii* com os basidiomicetos foi mostrada por estudos realizados por Rhodes, Kwon-Chung e Popkin (1981), que, através da análise ultra-estrutural das hifas formadas após conjugação, mostraram a presença de septo doliporo, parede celular lamelar e hifas dicarióticas, características estas compatíveis com os basidiomicetos.

Análises da composição das bases de DNA nuclear (G+C), e dos padrões de eletroforese das proteínas celulares têm mostrado a natureza heterogênea de *C. laurentii*. Com base na seqüência da região D1/D2 do rDNA 26S e regiões ITS (internal transcribed spacer), o complexo *C. laurentii* foi dividido em 2 grupos filogenéticos, I e II. De acordo com os estudos realizados, diferentes espécies têm sido reclassificadas, inclusive em outros gêneros, e ainda, outras incluídas no complexo *C. laurentii* (SUGITA et al., 2000; TAKASHIMA et al., 2003).

Atualmente é caracterizado como um patógeno humano emergente, sendo que as infecções ocorrem quase que exclusivamente em indivíduos imunocomprometidos (AVERBUCH et al., 2002). Os casos de criptococose por *C. laurentii* no homem incluem doença disseminada no sistema nervoso central, lesões na pele em adulto imunocompetente, fungemia em neonato, fungemia em paciente com câncer refratário à terapia com fluconazol, pneumonia e infecção de orofaringe em paciente com leucemia e infecção cutânea (BAUTERS et al., 2002; JOHNSON; BRADLEY; KAUFFMAN, 1998; KAMALAN; YESUDIAN; THAMBIAH, 1977; KORDOSSIS et al., 1998; KUNOVA; KRCMERY, 1999; SHANKAR et al., 2006; VLCHKOVA-LASHKOSKA et al., 2004).

1.3 – *Cryptococcus albidus*

C. albidus apresenta células globosas ou ovóides, e com cápsulas. É encontrado no ambiente relacionado a vegetais, excretas de aves, podendo transitoriamente colonizar a pele humana; os relatos de infecções em humanos e animais são raros, e geralmente ocorrem em indivíduos com deficiência da imunidade celular. No homem foi isolado causando meningite, osteomielite, septicemia, e infecções de pele, pulmonar e ocular. Em animais há relatos de infecção genital e ceratite micótica em equinos e infecção sistêmica em cães (GARELICK et al., 2004; JOHNSON; BRADLEY; KAUFFMAN, 1998; KORDOSSIS et al., 1998; KURTZMAN; FELL, 1998; LABRECQUE; SYLVESTRE; MESSIER, 2005; LOISON et al., 1996; NARAYAN et al., 2000; ROSARIO et al., 2005). Crescem bem à temperatura de 30°C, sendo que alguns isolados apresentam crescimento a 37°C. Estudos das características fisiológicas, bioquímicas e moleculares têm revelado a diversidade genética desta espécie. Ela é estreitamente relacionada à espécie *C. diffluens*, da qual difere somente na utilização de metil-alfa-D-glicosídeo. A análise da seqüência de ITS pode ser uma alternativa confiável de distinguir as duas espécies (FONSECA; SCORZETTI; FELL, 2000; SUGITA et al., 2001).

As colônias em ágar Sabouraud dextrose, a 25°C, variam de bege a rosa claro, lisas a rugosas e mucóides a opacas. A micromorfologia em ágar fubá-Tween 80, após 72 horas de incubação a 25°C, mostra células globosas ou ovóides, com cápsula, sem pseudo-hifas ou hifas verdadeiras (KURTZMAN; FELL, 1998).

1.4 – Fatores de virulência

Vários fatores de virulência são importantes para a patogenicidade de *C. neoformans* e *C. gattii*: cápsula polissacarídica, produção de melanina, capacidade de crescimento a 37°C, produção das enzimas fosfolipase, proteinase e urease (BUCHANAN; MURPHY, 1998; KOZEL, 1995; MITCHELL; PERFECT, 1995). Quanto às outras espécies do gênero, existem alguns relatos sobre fatores de virulência, principalmente em isolados ambientais de *C. laurentii* e *C. albidus* (BARONI, 2001; FILION; KIDD; AGUIRRE, 2006; PEDROSO; FERREIRA; CANDIDO, 2004).

1.4.1 – Cápsula

A cápsula polissacarídica extracelular é considerada um dos mais importantes fatores de virulência para *C. neoformans* e *C. gattii* (COENJAERTS, 2006). O principal componente molecular dessa estrutura é um polímero de alto peso molecular denominado glicuroxilomanana (GXM). Os mecanismos propostos para explicar a contribuição da cápsula para a virulência são a capacidade de inibir a fagocitose, e a proteção do microrganismo no interior de macrófagos (BUCHANAN; MURPHY, 1998; LEVITZ, 2001).

A comprovação da importância da cápsula na virulência ocorreu através de estudos conduzidos por Chang e Kwon-Chung (1994), em que o gene *CAP59*, tido como responsável pela produção de cápsula, foi deletado, resultando em uma levedura não produtora de cápsula e sem virulência para modelo murino. Após a reintrodução do gene, a condição de virulência foi restabelecida. Vários estudos foram realizados e comprovaram que outros genes, *CAP10*, *CAP60*, *CAP64*, *MAN1*, *CAS1* e *UXS1*, participam na biossíntese da cápsula, sendo os genes *CAP* essenciais nesse processo (CHANG; KWON-CHUNG, 1998;1999; OKABAYASHI et al., 2005; CHANG; PENOYER; KWON-CHUNG, 1996).

A espessura da cápsula varia conforme as condições ambientais e de acordo com o órgão envolvido. O aumento da espessura contribui para a resistência à fagocitose durante a infecção em animais (ELLERBROEK et al., 2004; ZARAGOZA; CASADEVALL, 2004).

O envolvimento desta estrutura na virulência para *C. albidus* e *C. laurentii* ainda não foi comprovado. Estudos realizados por Bystricky, Paulovicová e Machová (2004) mostraram que o constituinte capsular de *C. laurentii*, galactoglicoxilomana (GalGXM), é imunogênico para coelhos. Componentes da estrutura da cápsula de *C. albidus* têm mostrado atividade contra o vírus do mosaico do tabaco, com perspectivas na proteção de cultivo de plantas (KOVALENKO; BARKALOVA, NAHORRINA, 2005).

Várias condições *in vitro* induzem ao aumento da expressão da cápsula, como alto nível de CO₂, baixo nível de ferro e baixa quantidade de glicose. O crescimento em meio líquido Sabouraud contendo pequena quantidade de glicose (0,1%) é um dos meios mais eficientes para indução de cápsula em isolados de *C. neoformans* (OKABAYASHI et al., 2005; ZARAGOZA; CASADEVALL, 2004).

1.4.2 – Termotolerância

A capacidade de sobreviver e replicar a 37°C é denominada termotolerância, e é uma característica comum dos fungos patogênicos. *C. neoformans*, *Histoplasma capsulatum* e *Sporothrix schenckii*. A habilidade de crescer a essa temperatura, em uma atmosfera de aproximadamente 5% de CO₂, e pH de 7,3 a 7,4 é crucial para o fungo invadir o tecido e causar infecção (BUCHANAN; MURPHY, 1998). Rhodes (1988) observou que muitos isolados de *C. neoformans* var. *gattii*, que apresentavam dificuldade em crescer a 37°C, não eram capazes de levar à morte camundongos infectados experimentalmente, enquanto que isolados de *C. neoformans* var. *neoformans*, que cresciam bem a 37°C, levavam os animais à morte.

Em estudos realizados por Odom et al. (1997), tentando estabelecer características genóticas relacionadas com a sobrevivência do microrganismo a temperaturas mais altas, demonstraram que *C. neoformans* tem um gene que codifica a subunidade catalítica A da proteína calcineurina, que apresenta relação com a sobrevivência a 37°C. Esta proteína, segundo os autores, é uma fosfatase específica para serina e treonina, sendo ativada pela calmodulina cálcica, e está envolvida na resposta ao estresse em leveduras. A calcineurina A é um requisito básico para *C. neoformans* sobreviver à temperatura do hospedeiro, portanto, um fator necessário para a patogenicidade do fungo (CRUZ; FOX; HEITMAN, 2001; ODOM et al., 1997).

1.4.3 – Melanina

Melaninas são macromoléculas formadas pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos ou indólicos, hidrofóbicos e negativamente carregados. Frequentemente os pigmentos resultantes são marrons ou pretos, porém muitas outras cores têm sido observadas (BUTLER et al., 2001; LANGFELDER et al., 2002). É um polímero encontrado em diversas espécies de seres vivos, de todos os reinos biológicos (HILL, 1992). Vários tipos de melanina são descritos em bactérias, plantas, animais, e fungos. São reconhecidos quatro tipos principais de melanina: eumelanina, feomelanina, alomelanina e piomelanina. A eumelanina é formada por um processo complexo, envolvendo quinonas e radicais livres. A feomelanina deriva de tirosina e cisteína. A alomelanina é sintetizada a partir de precursores livres de nitrogênio. A piomelanina é derivada do catabolismo de tirosina via p-hidroxi-fenilpiruvato e ácido homogentísico. As melaninas são insolúveis em água e solventes orgânicos, e

conseqüentemente, difíceis de serem estudadas por técnicas biofísicas ou bioquímicas convencionais (FRASES et al., 2007; GÓMEZ; NOSANCHUK, 2003).

Vários fungos patógenos humanos formam melanina: *Aspergillus nidulans*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium carrionii*, *Exophiala (Wangiella) dermatitidis*, *Exophiala jeanselmei*, *Fonsecaea compacta*, *F. pedrosoi*, *Hendersonulla toruloidea*, *Phaeoannellomyces werneckii*, *Phialophora richardsiae*, *P. verrucosa*, *Xylohypha bantiana*, e *Sporothrix schenckii* (GÓMEZ; NOSANCHUK, 2003). Diferente destes fungos patogênicos, *C. neoformans* e *C. gattii* produzem eumelanina somente na presença de precursores exógenos, como L-3,4-diidrofenilalanina (L-dopa) e epinefrina, que são compostos difenólicos (POLACHECK; HEARING; KWON-CHUNG, 1982; SALAS et al., 1996; WILLIAMSON, 1994). Estes compostos são oxidados ao intermediário quinona, que sofre autopolimerização (POLACHECK; KWON-CHUNG, 1988), e forma uma camada elétron-densa na parede celular, que é evidenciada macroscopicamente pela pigmentação escura da célula (KWON-CHUNG; POLACHECK; POPKIN, 1982; WANG; AISEN; CASADEVALL, 1995). A síntese de melanina em *C. neoformans* é catalizada pela enzima lacase, uma fenol-oxidase ou difenol-oxidase, que produz pigmentos a partir de compostos fenólicos e difenólicos com dois grupos hidroxilas, mas não de tirosina. Dois genes são responsáveis pela produção dessa enzima, *Lac1* e *Lac2* (MISSALL et al., 2005; WILLIAMSON, 1994).

A produção de melanina é associada com a virulência de muitos microrganismos. Acredita-se que ela seja responsável pela proteção da célula microbiana do ataque oxidativo durante a infecção. Outras funções atribuídas a este pigmento são proteção da célula a extremos de temperatura, radiação ultra-violeta, fagocitose, e também parece estar envolvida na diminuição da sensibilidade à anfotericina B (IKEDA et al., 2003; JACOBSON; TINNELL, 1993; KWON-CHUNG; POLACHECK; POPKIN, 1982; RHODES; POLACHECK; KWON-CHUNG, 1982; ROSAS; CASADEVALL, 1997; WANG; AISEN; CASADEVALL, 1995; WANG; CASADEVALL, 1994a; WANG; CASADEVALL, 1994b; WANG; CASADEVALL, 1994c).

Além de *C. neoformans* e *C. gattii*, outras espécies do gênero também produzem melanina em menor quantidade, conforme demonstrado por Ikeda et al. (2002). Estes autores relataram a capacidade de *C. albidus* e *C. laurentii* expressarem lacase, porém ressaltam a possibilidade da enzima ter estrutura molecular diferente, o que explicaria a menor produção do pigmento.

1.4.4 – *Mating types*

O *mating type* de *C. neoformans* é definido por um locus com 2 alelos alternativos, *MATa* e *MATα*. A identificação do *MAT* é feita por cruzamento entre isolados com tipos conjugantes opostos, de onde originam-se as estruturas de frutificação. Todavia é um processo trabalhoso, que muitas vezes apresenta falha. Atualmente, a determinação do *mating* é realizada através do método de PCR, com *primers* específicos para os genes *STE12* (*MATa*), *STE20* (*MATa* e *MATα*) e outros, presentes no *locus* de *mating*, que são específicos para cada tipo. A análise por PCR permitiu uma maior compreensão da epidemiologia do fungo, por ser mais rápida, e oferecer resultados mais precisos (IDNURM et al., 2005; LENGELER et al., 2001; OKABAYASHI et al., 2006).

O estudo e a identificação do *mating type* chamaram a atenção de alguns pesquisadores, devido à predominância do tipo α , e seu relacionamento com a virulência do microrganismo (BARCHIESI et al., 2005; KWON-CHUNG; EDMAN; WICKES, 1992; MITCHELL, 2003; OKABAYASHI et al., 2006). Estudos conduzidos por Kwon-Chung, Edman e Wickes (1992) utilizando a progênie de *C. neoformans* sorotipo D, *MATα* e *MATa*, em camundongos, mostraram a maior virulência do *MATα* em relação a *MATa*. Neste estudo, 80 a 90% dos camundongos infectados com a progênie *MATα* morreram em 30 dias, enquanto que somente 20 a 50% dos camundongos infectados com a progênie *MATa* morreram no mesmo período.

Barchiesi et al. (2005) analisaram a patogenicidade de diferentes sorotipos e *mating types* de *C. neoformans*. Os isolados $A\alpha$ e os híbridos $A\alpha/Da$ levaram à morte 100% dos animais em um período médio de tempo significativamente menor que os outros sorotipos e *mating types* analisados. A mortalidade entre os isolados $A\alpha$ ocorreu até 29 dias após a infecção, enquanto que entre $A\alpha/Da$ em 45 dias. A taxa de mortalidade variou de 10 a 90% em 60 dias para os isolados Aa , Da , $D\alpha$ e $Aa/D\alpha$. De acordo com estes resultados, os autores concluíram que o alelo $A\alpha$ está mais relacionado com a virulência, enquanto que a presença do alelo Aa ou Da está associado com moderada ou ausência de virulência, e os isolados $D\alpha$ apresentam variação quanto à essa característica.

1.4.5 – Fosfolipase

As fosfolipases constituem um grupo heterogêneo de enzimas que são capazes de hidrolizar uma ou mais ligações ésteres de glicerofosfolipídeos. As ações das fosfolipases podem resultar em desestabilização de membranas, lise celular e liberação de lipídeos (GHANNOUM, 2000; SCHMIEL; MILLER, 1999). Estas enzimas são classificadas de acordo com a especificidade da ligação éster que é clivada. Assim sendo, a fosfolipase pode ter atividade de fosfolipase B (PLB, remove ambas as cadeias acil de glicerofosfolipídeo), atividade de lisofosfolipase (remove a única cadeia acil de lisofosfolipídeos), e atividade de transacilase (adiciona radicais acil a lisofosfolipídeos para formar fosfolipídeos). É conhecido, no entanto, que o produto de um único gene apresenta as três atividades, fosfolipase B, lisofosfolipase (LPL) e lisofosfolipase transacilase (LPTA) em *Candida albicans*, *Penicillium notatum* e *Saccharomyces cerevisiae*. Nestas espécies, as enzimas têm sido chamadas de fosfolipase B. Em *C. neoformans*, a enzima fosfolipase extracelular compartilha as atividades de fosfolipase B, lisofosfolipase e lisofosfolipase transacilase (COX et al., 2001).

A atividade de fosfolipase foi detectada em *C. albicans*, *Malassezia furfur*, *Rhodotorula rubra*, *S. cerevisiae*, *C. neoformans*, *C. albidus* e *C. laurentii* (BARONI, 2001; CHEN et al., 1997; MAYSER et al., 1996; PEDROSO, FERREIRA, CANDIDO, 2004; RICIPUTO et al., 1996; VIDOTTO et al., 1996; WITT; MERTSCHING; KONIG, 1984).

Essa enzima atua como um fator de virulência, pois auxilia *C. neoformans* na invasão tecidual, agindo na camada externa de membranas celulares e surfactantes pulmonares, ricas em fosfolipídeos (CHEN et al., 1997; LEVITZ, 2001; SANTANGELO et al., 1999). Chen et al. (1997) demonstraram atividades de fosfolipase, lisofosfolipase e lisofosfolipase transacilase em 49 dentre 50 isolados de *C. neoformans* estudadas, utilizando o meio ágar gema de ovo, preconizado por Price, Wilkinson e Gentry (1982), o qual tem se mostrado eficiente na demonstração da atividade dessa enzima *in vitro*.

A PLB é uma proteína codificada pelo gene *PLB1* (COX et al., 2001). Estudos mais recentes, envolvendo modelos murinos e fagócitos mononucleares, têm relacionado a PLB com a sobrevivência intracelular, com o crescimento e replicação de *C. neoformans* nos macrófagos, e ainda, na disseminação do microrganismo a linfonodos pulmonares (COX et al., 2001; FELDMESSER et al., 2000; NOVERR et al., 2003; SANTANGELO et al., 2004). A PLB está envolvida no início e desenvolvimento da criptococose pulmonar, sendo essencial para a entrada do microrganismo nos linfáticos pulmonares e no sangue, mas não no sistema nervoso central (SANTANGELO et al., 2004).

1.4.6 – Proteinase

Muitos fungos secretam proteases extracelulares que estão relacionadas com a patogênese. Estas enzimas hidrolisam ligações peptídicas de importantes proteínas do tecido do hospedeiro (colágeno), digerem proteínas de importância imunológica (anticorpos e complementos), e facilitam a aderência e a sobrevivência do patógeno em superfícies mucosas (CHEN; BLANK; CASADEVALL, 1996; KUROKAWA; SUGIZAKI; PERAÇOLI, 1998).

Estudos de infecção experimental em ratos mostraram que *C. neoformans* penetra no parênquima pulmonar horas depois de ter sido depositado no espaço alveolar, sugerindo que o fungo produza substâncias que rompem o tecido, como enzimas proteolíticas (GOLDMAN; LEE; CASADEVALL, 1994). A produção *in vivo* de proteinase foi observada em estudos histológicos de tecidos de camundongo infectado com *C. neoformans*, pela demonstração da degradação de fibrilas do colágeno (SALKOWSKI; BALISH, 1991). Os primeiros estudos publicados a respeito da atividade proteolítica *in vitro* de *C. neoformans* mostram dados discrepantes. Staib (1964) estudou 32 isolados e não encontrou nenhuma atividade proteolítica em ágar soro humano; Ahearn, Meyers e Nichols (1968) estudaram 8 isolados e encontraram atividade proteolítica em 3, Federici (1982) estudou 7 isolados e encontrou atividade proteolítica em 2. No entanto, estudos posteriores confirmaram a atividade proteolítica *in vitro* de *C. neoformans* (AOKI et al.; 1994; HAMILTON; GOODLEY, 1996). Aoki et al. (1994) demonstraram a produção de proteinase em 8 isolados estudados em diferentes meios. Essa controvérsia na literatura, segundo Chen, Blank e Casadevall (1996), ocorre devido às diferentes condições de incubação e diferentes formulações dos meios utilizados para detectar a atividade da enzima. A produção *in vitro* da enzima foi descrita também em isolados de *C. albidus* e *C. laurentii* (BARONI, 2001; PEDROSO; FERREIRA; CANDIDO, 2004).

Há evidências de que *C. neoformans* pode alterar seu fenótipo de produção de proteinase, tanto pela passagem em camundongos (BARONI, 2001), como em isolados seqüenciais obtidos de mesmo paciente após recorrência de meningoencefalite (FRANZOT et al., 1998).

Recentemente, Pinti et al. (2007) identificaram, clonaram e seqüenciaram um cDNA de *C. neoformans* que codifica uma aspartil protease putativa (CnAP1), de 505 aminoácidos, e seu correspondente gene (*cnap1*). Também mostraram que a expressão de *cnap1* depende da fase de crescimento, com maior expressão na fase estacionária que na fase exponencial.

1.4.7 – Urease

A urease é uma metaloenzima que catalisa a hidrólise de uréia a amônia e carbamato, que em condições fisiológicas, provoca aumento do pH. A importância desta enzima como fator de virulência foi demonstrada nas bactérias *Helicobacter pylori* e *Proteus mirabilis*, e nos fungos de importância clínica *C. neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* e espécies de *Trichosporon* e *Aspergillus* (COX et al., 2000). Em estudos de patogênese bacteriana, a urease parece ter papel importante na alteração da função imune do hospedeiro e também no aumento do pH microambiental no sítio da infecção. Porém, na patogênese da criptococose, esse fenômeno parece ter pouca ou nenhuma importância, de acordo com estudos realizados por Levitz et al. (1999). Estes pesquisadores analisaram o pH do fagolisossomo após a ingestão do microrganismo por fagócitos humanos, e relataram que este permanecia constante, sugerindo que a urease poderia ter pouca ou nenhuma influência na manutenção da infecção. Estes resultados corroboram com os achados na literatura de alguns casos de infecções por isolados que não produzem a urease (BAVA; NEGRONI; BIANCHI, 1993; RUANE; WALKER; GEORGE, 1988).

Cox et al. (2000), mostraram que esta enzima pode ser importante para a levedura sobreviver em hospedeiros humanos. Eles exploraram a contribuição da urease para a virulência em infecção experimental, clonaram, sequenciaram e silenciaram a cópia única do gene da urease de *C. neoformans*. Os resultados sugeriram que a atividade da urease não é necessária para a sobrevivência da levedura no líquido de coelhos imunossuprimidos, depois da inoculação direta neste sítio. Porém, em modelo murino, observaram aumento na sobrevivência de camundongos infectados com o mutante urease negativa. A virulência do selvagem e mutante reconstituído foi significativamente maior que do mutante urease negativa. Parece que a atividade de urease é um fator de virulência para o modelo murino, mas não é para coelho. O achado de que o isolado urease negativo tem virulência comparável ao selvagem em modelo de coelho, enquanto em camundongo apresenta atenuação da virulência, enfatiza o conceito acerca dos estudos de virulência: genes de virulência podem ser importantes em certos modelos animais (COX et al., 2000).

Olszewski et al. (2004) estudaram o papel da urease na invasão do sistema nervoso central, utilizando camundongos. Verificaram que a inoculação direta de *C. neoformans* no cérebro, do selvagem (H99), do isolado com deleção para o gene da urease (*URE1*) e do mutante reconstituído (*ure1 + URE1 - 1*), não demonstraram diferenças quanto à colonização pela levedura neste órgão. Todavia, quando o microrganismo foi inoculado via endovenosa, o

padrão de disseminação para os diferentes órgãos e o cérebro foi de uma menor disseminação cerebral para *ure1*, sugerindo que a urease facilite a invasão do sistema nervoso central por via hematogênica.

1.5 – Tratamento da criptococose e resistência aos antifúngicos

As infecções pulmonares sintomáticas geralmente são tratadas com fluconazol por um período de até 6 meses. Os pacientes que não toleram este antifúngico são tratados com itraconazol. Os casos de neurocriptococose, ou outra doença sistêmica grave, são tratados com anfotericina B por um período de até 10 semanas, seguido de terapia continuada com fluconazol ao longo de até 12 meses, dependendo do estado do paciente (SAAG et al., 2000). A 5-fluorocitosina geralmente não é utilizada sozinha porque pode levar à seleção de células resistentes durante a terapia, no entanto, quando associada à anfotericina B, minimiza os efeitos colaterais (ALVES et al., 1997; DISMUKES, 1993; PERFECT; COX, 1999).

As infecções causadas por outras espécies de *Cryptococcus* seguem o mesmo protocolo de tratamento, visto que as recomendações são limitadas devido ao pequeno número de casos reportados, que foram tratados empiricamente (KHAWCHAROENPORN; APISARNTHANARAK; MUNDY, 2007).

Os novos azóis voriconazol e posaconazol têm mostrado efetividade *in vitro* contra *C. neoformans*, no entanto, a eficácia clínica ainda não foi completamente estabelecida (CUENCA-ESTRELLA et al., 2006). As equinocandinas caspofungina, micafungina e anidulafungina têm demonstrado potente atividade antifúngica *in vitro* para uma ampla variedade de fungos, mas não contra espécies de *Cryptococcus* (KHAWCHAROENPORN; APISARNTHANARAK; MUNDY, 2007).

A resistência *in vitro* de *C. neoformans* aos agentes antifúngicos é pouco citada na literatura. São relatados alguns casos de resistência à anfotericina B (KELLY et al., 1994) e ao fluconazol (ALVES; GRIEBELER; GOULART, 2002; FRIESE et al., 2001; PAUGAM et al., 1994). Casos de resistência envolvendo espécies não-*neoformans* também são descritos. Manfredi et al. (2006) relataram um caso de meningoencefalite por *C. laurentii* resistente à anfotericina B, ocorrido após dois episódios de meningite por *C. neoformans*, que haviam sido tratados com anfotericina B. Segundo Khawcharoenporn, Apisarntharak e Mundy (2007), a resistência primária é mais freqüente para fluconazol e fluorocitosina, e em relação ao fluconazol, ocorre principalmente em isolados de pacientes que receberam profilaxia prévia com azóis. Assim, estes autores sugerem a realização de testes *in vitro* de

suscetibilidade ao fluconazol em isolados de pacientes com exposição prévia a esse grupo de drogas.

A resistência aos azóis tem sido mais estudada em isolados de *C. albicans* e *S. cerevisiae*. Múltiplos mecanismos foram identificados, como o aumento da expressão de transportadores multidrogas, alterações no sítio ativo da enzima lanosterol demetilase, e aumento da expressão desta enzima. Estudos genéticos com *S. cerevisiae* confirmaram que cada um desses mecanismos pode operar sozinho para conferir grau variado de resistência aos azóis (SANGLARD et al., 1998; HENRY; NICKELS; EDLIND, 2000). A ação de bombas de efluxo leva ao transporte da droga do meio intracelular para o extracelular, resultando em diminuição de seu acúmulo no interior da célula (LOEFFLER; STEVENS, 2003; LOPEZ-RIBOT et al., 1999; SANGLARD et al., 1998). A alteração no sítio ativo da enzima, por sua vez, leva à diminuição da afinidade à droga, enquanto que o aumento da expressão da enzima leva ao excesso de alvos para as moléculas da droga, excedendo a capacidade inibitória da mesma (GHANNOUM; RICE, 1999; WHITE; MARR; BOWDEN 1998).

A maior parte dos estudos referentes à atuação e caracterização dos transportadores em leveduras patogênicas foram realizados em *C. albicans*. O bombeamento das moléculas de azóis para o meio extracelular, através da membrana, é feito por proteínas pertencentes à superfamília *adenosine triphosphate-binding cassette (ATP binding cassette – ABC)*, codificadas pelos genes *CDR1* e *CDR2*, e à superfamília *major facilitator* (codificada pelo gene *MDR1*). Em *Candida* foi descrito pelo menos 5 diferentes genes *CDR – Candida Drug Resistance* (LOEFFLER; STEVENS, 2003; PRASAD et al., 1995; SANGLARD et al., 1995). Os genes *CDR* têm sido correlacionados com a resistência ao fluconazol e a outros azóis.

Sanglard et al. (1995) estudaram os níveis de RNA mensageiro do gene *CDR1* em 16 isolados clínicos de *C. albicans* recuperados de cinco pacientes com AIDS. Estes isolados desenvolveram resistência ao fluconazol durante o tratamento prolongado com este antifúngico. A diminuição no acúmulo deste antifúngico em alguns isolados foi associada com aumentos de aproximadamente duas vezes nos níveis de RNAm do gene *CDR1*, indicando indiretamente o envolvimento desse mecanismo na resistência do microrganismo ao antifúngico.

A *CDR1* é uma proteína transportadora em *Candida* e *Cryptococcus*, para a qual drogas azólicas, e outras, como cicloheximida e cloranfenicol, são substratos (LOEFFLER; STEVENS, 2003; PRASAD et al., 1995; SANGLARD et al., 1995).

Posteraro et al. (2003) descreveram que o efluxo ativo da droga da célula foi o mecanismo de resistência de um isolado de *C. neoformans* por eles estudado. Recentemente,

Sanguinetti et al. (2006) descreveram um gene de *C. neoformans* que codifica um transportador ABC, denominado *AFR1* (*antifungal resistance 1*, denominado *CnAFR1*), que estava envolvido na resistência *in vitro* ao fluconazol.

A enzima 14-alfa-esterol-demetilase é codificada pelos genes *CYP51A* e *CYP51B* (de *Aspergillus fumigatus*), também denominados *ERG* (MELLADO et al., 2001). Estes genes possuem grande identidade (40 a 70%) com regiões conservadas do gene da citocromo P450-demetilase de outros fungos filamentosos e leveduras, e estão presentes em uma única cópia no genoma de vários fungos, entre eles *C. neoformans*, *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. A resistência a baixos níveis de fluconazol em alguns isolados de *C. neoformans* tem sido relacionada a mudanças na afinidade da 14-alfa-demetilase aos azóis (VENKATESWARLU et al., 1997). Este mecanismo, originado de mutação genética, foi descrito para isolados clínicos seqüenciais de *C. albicans* (LOPEZ-RIBOT et al., 1999; MARTINEZ et al., 2002), e recentemente para isolados seqüenciais de *C. neoformans* (ALMEIDA, 2005; RODERO et al., 2003).

Rodero et al. (2003) mostraram que um ponto de mutação no gene *ERG11* foi responsável pela resistência ao fluconazol em isolado clínico de *C. neoformans*, de modo semelhante ao que tem ocorrido com isolados de *C. albicans*. Eles empregaram o método de PCR para amplificação do gene *ERG11* seguido do seu seqüenciamento, em isolados clínicos seriados, recuperados de pacientes submetidos ao tratamento com fluconazol. A mutação encontrada no gene levou a substituição da glicina da posição 484, por serina (G484S), que por sua vez, levou à modificação de parte do domínio conservado da proteína, que é estável em todas as seqüências da citocromo P450-demetilase de leveduras e fungos filamentosos. Esta modificação alterou a orientação do domínio, diminuindo a capacidade de ligação dos azóis, reduzindo, assim, a atividade catalítica da enzima.

A superexpressão da enzima alvo dos azóis é outro mecanismo de resistência que foi demonstrado em *C. glabrata* e *C. albicans*, e parece ocorrer devido à desrepressão do gene regulador do *ERG11* (SANGLARD et al., 1995; VANDEN BOSSCHE et al., 1992).

1.6 – Criptococose experimental

Os modelos de infecção experimental são importantes para o estudo da patogênese e para o acompanhamento do tratamento. Eles ocupam posição essencial no estudo de doenças infecciosas, como resultado de problemas éticos da exposição de humanos a agentes potencialmente letais (WILES et al., 2006; ZAK; O'REILLY, 1993).

A indução de infecções em modelos animais bem definidos fornece informações acerca do processo da doença, aproximando-se do seu contexto natural, apesar das diferenças existentes entre estas infecções e as induzidas. O modelo é somente uma representação do processo natural da doença, e deverá ser apropriado para o processo que se deseja estudar, envolvendo os vários fatores, como, por exemplo, a integração do conhecimento com os múltiplos ambientes em que a doença se estabelece (WILES et al., 2006).

No estudo da criptococose, os modelos mais utilizados são ratos, coelhos e camundongos, para avaliar, principalmente, a patogenicidade e os fatores de virulência do microrganismo, e a imunidade do hospedeiro. A escolha da espécie animal e da via de inoculação do microrganismo depende do objetivo e do grau de reprodutibilidade desejado (SEGAL; BAUM, 1994). A via intraperitoneal talvez seja a mais conveniente pela facilidade. A intracerebral permite o estudo da proliferação das leveduras no sistema nervoso central, que é o sítio clínico mais importante da infecção. A intravenosa é uma técnica quantitativa e padronizada, e fornece respostas a respeito da disseminação do microrganismo para os diferentes órgãos. As vias intranasal e intratraqueal permitem a avaliação da capacidade do microrganismo se disseminar a partir dos pulmões, e podem melhor simular a infecção natural, porém apresenta considerável variabilidade (CASADEVALL; PERFECT, 1998; DIXON; POLAK, 1986).

Os camundongos, das diversas linhagens, são animais suscetíveis à infecção por *Cryptococcus* e são os modelos mais utilizados, pelo baixo custo, pela facilidade no manuseio, e devido à disponibilidade de diversas linhagens caracterizadas geneticamente (WICKES; KWON-CHUNG, 2002). As infecções nestes animais podem ser subclínicas ou letais, na dependência do tamanho do inóculo, da via de inoculação, da cepa considerada, da linhagem e do estado imunológico do animal. Nestas condições é possível estudar os fatores envolvidos na virulência, as diferentes linhagens de microrganismos, o tropismo para os diferentes órgãos, o comportamento de diferentes linhagens de camundongos frente a um isolado em particular, o comportamento do sistema imunológico e sua relação com a doença, e ainda, a eficácia de drogas antifúngicas (CASADEVALL; PERFECT, 1998).

Assim, pelo menos dois tipos de estudos podem ser conduzidos, conforme o objetivo, quando se trata de infecção experimental em animais: avaliar a disseminação e tropismo do microrganismo para diferentes tecidos, e avaliar a sobrevivência do hospedeiro (SAGAL; BAUM, 1994).

A avaliação da carga fúngica nos diferentes órgãos permite avaliar a disseminação do microrganismo e sua depuração pelo hospedeiro. Possibilita, ainda, analisar a eficiência do

sistema imunológico do animal, a virulência do microrganismo, a eficácia do tratamento com drogas antifúngicas, e comparar a resposta do hospedeiro a diferentes linhagens de microrganismo (CHRETIEN et al., 2002; WICKES; KWON-CHUNG, 2002).

A avaliação da sobrevivência do hospedeiro é feita determinando-se a taxa de sobrevivência ou de morte de animais, de acordo com o período de tempo, após a infecção experimental. Permite comparar as diferenças entre a virulência de diferentes linhagens de microrganismos, desde que se utilizem animais previamente padronizados (por exemplo, que apresentem peso, idade e padrão de resposta imunológica semelhantes), relacionando-se a diferença nos tempos de evolução da infecção até a morte do animal (CAZZANIGA, 2006; WICKES; KWON-CHUNG, 2002).

2 – JUSTIFICATIVA

A análise da virulência de leveduras do gênero *Cryptococcus* envolve a infecção experimental, comparação do índice de mortalidade, histopatologia e presença de leveduras em órgãos e tecidos (MITCHELL; PERFECT, 1995). Estudos *in vitro* de fatores de virulência são igualmente importantes, principalmente quando estudados em conjunto, pois podem revelar a capacidade patogênica do microrganismo. Estes estudos também são fundamentais para a compreensão da patogênese da criptococose (KOZEL, 1995), e auxiliam na compreensão da biologia do microrganismo. São, ainda, importantes para o desenvolvimento de estratégias de controle e erradicação do agente infeccioso, para o avanço da terapia, sugestão de estratégias preventivas e de novos métodos de diagnóstico (DOERING et al., 1999; ESCADÓN et al., 2006).

Três características fenotípicas de *C. neoformans*, que são crescimento a 37°C, cápsula polissacarídica extracelular e atividade de lacase, são importantes fatores envolvidos na patogenicidade do fungo. A produção de enzimas extracelulares, como a fosfolipase, proteinase e urease também estão relacionadas com a patogênese da infecção. Outras espécies do gênero, por exemplo, *C. albidus* e *C. laurentii*, produzem alguns desses fatores, às vezes isoladamente, às vezes em conjunto, o que pode ser importante para a patogenicidade destas espécies, considerando os relatos de envolvimento em processos infecciosos (FILION; KIDD; AGUIRRE, 2006; PEDROSO, 2004).

A literatura também mostra evidência de que *C. neoformans* pode alterar seu fenótipo relacionado à virulência, e quanto à concentração inibitória mínima de antifúngicos, em casos de recorrência da infecção em pacientes imunocomprometidos, e também após a inoculação em modelos animais (BARONI, 2001; BLASI et al., 2001; CLANCY et al. 2006; CURRIE et al., 1995; FRANZOT et al., 1998; McCLELLAND et al., 2005; PAUGAN et al., 1994; SILVA et al., 2006b).

Com base no exposto, e considerando que não existem estudos na literatura caracterizando fatores de virulência e patogenicidade *in vivo* de isolados ambientais de *C. albidus* e *C. laurentii*, e ainda que algumas amostras de *C. neoformans* isoladas do ambiente em Ribeirão Preto-SP nos anos de 2002 e 2003 não foram caracterizadas quanto à patogenicidade e tipagem molecular, propusemos a realização deste estudo.

3 – OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

- 1 - Determinar a curva de sobrevivência de camundongos BALB/c e o tropismo para os diferentes órgãos, após a inoculação intravenosa de isolados de *C. neoformans*, *C. albidus* e *C. laurentii*;
- 2 - Pesquisar os fatores de virulência: produção de melanina, crescimento a 37°C, produção de fosfolipase, de proteinase e de urease, nos isolados de *C. neoformans*, *C. albidus* e *C. laurentii* antes e depois da inoculação em animais;
- 3 - Determinar e comparar a concentração inibitória mínima do fluconazol para os isolados de *C. neoformans*, *C. albidus* e *C. laurentii*, antes e após a inoculação em animais;
- 4 - Avaliar os sorotipos e *mating types* dos isolados de *C. neoformans* utilizando a técnica de PCR;
- 5 - Investigar a presença dos genes relacionados aos fatores de virulência *Lac1* (lacase), *PLB1* (fosfolipase), *cnap1* (proteinase), *URE1* (urease) e *CNA1* (calcineurina), por PCR, nos isolados de *C. neoformans*, *C. albidus* e *C. laurentii*, antes e após a inoculação em animais;
- 6 - Pesquisar o gene *ERG11* por PCR em *C. neoformans*, *C. albidus* e *C. laurentii*, antes e após a inoculação em animais;
- 7 - Realizar a tipagem molecular por PCR-*fingerprinting* dos isolados de *C. neoformans* e compará-la antes e depois da inoculação em animais;
- 8 - Determinar o perfil molecular por PCR-*fingerprinting* dos isolados de *C. albidus* e *C. laurentii*, e compará-lo antes e depois da inoculação em animais.

4 – CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

1. Todos os animais sobreviveram após a inoculação com *C. laurentii* e *C. albidus*;
2. Nenhum animal sobreviveu após a inoculação com *C. neoformans*;
3. Todos os isolados de *C. neoformans* foram recuperados dos pulmões e do cérebro dos animais no 7º e 14º dia após a inoculação;
4. *C. albidus* foi isolado principalmente do fígado e dos pulmões em até 10 dias;
5. *C. laurentii* foi encontrado principalmente nos pulmões e cérebro, em até 120 dias;
6. Os fatores de virulência avaliados, tamanho da cápsula, termotolerância a 37°C, melanina, proteinase, fosfolipase e urease, assim como a CIM do fluconazol, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas considerando os isolados das três espécies estudadas antes e após a inoculação em animais;
7. Todos os isolados de *C. neoformans* estudados foram do sorotipo A, *mating type* α ;
8. Os genes de virulência: *Lac1*, *PLB1*, *cnap1*, *URE1* e *CNA1* foram encontrados somente nos isolados de *C. neoformans*, antes e depois da inoculação em animais;
9. O gene *ERG11* íntegro foi encontrado em *C. neoformans*, e provavelmente parcial em *C. albidus*, antes e depois da inoculação em animais;
10. Os tipos moleculares de *C. neoformans* encontrados foram VNI (7/10) e VNII (3/10), e mantiveram-se com os mesmos perfis de bandas nos isolados antes e depois da inoculação em animais;
11. A tipagem molecular dos isolados de *C. albidus* revelou alta homogeneidade genética;
12. A tipagem molecular dos isolados de *C. laurentii* revelou alta diversidade genética.

5 – REFERÊNCIAS¹

AHEARN, D.G.; MEYERS, S.P.; NICHOLS, R.A. Extracellular proteinases of yeasts and yeastlike fungi. **Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 16, n. 9, p 1370-1374, Sep 1968.

ALMEIDA, A.M.F. **Caracterização molecular de polimorfismos e do gene *ERG11* associados a mecanismos de resistência a drogas antifúngicas em isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans***. 2005. 145 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2005.

ALVES, S.H.; GRIEBELER, J.; GOULART, L.S. Aspectos atuais da resistência aos antifúngicos azólicos e poliênicos. **Infarma**, Brasília, v. 15, n. 3-4, p. 75-77, Nov/Dez 2002.

ALVES, S.H.; LOPES, J.O.; COSTA, J.M.; KLOCK, C. Development of secondary resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* isolated from a patient with AIDS. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 39, n. 6, p. 359-362, Nov/Dec 1997.

AOKI, S.; ITO-KUWA, S.; NAKAMURA, K.; KATO, J.; NINOMIYA, K.; VIDOTTO, V. Extracellular proteolytic activity of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 128, n. 3, p. 143-150, Dec 1994.

AVERBUCH, D.; BOEKHOUTT, T.; FALK, R.; ENGELHARD, D.; SHAPIRO, M.; BLOCK, C; POLACHECK, I. Fungemia in a cancer patient caused by fluconazole-resistant *Cryptococcus laurentii*. **Med. Mycol.**, Oxford, v. 40, n. 5, p. 479-484, Oct 2002.

BARCHIESI, F.; COGLIATI, M.; ESPOSTO, M.C.; SPREGHINI, E.; SCHIMIZZI, A.M.; WICKES, B.L.; SCALISE, G.; VIVIANI, M.A. Comparative analysis of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* serotypes A, D and AD in murine cryptococcosis. **J. Infect.**, London, v. 51, n. 1, p. 10-16, Jan 2005.

BARLUZZI, R.; BROZZETTI, A.; MARIUCCI, G.; TANTUCCI, M.; NEGLIA, R.G.; BISTONI, F.; BLASI, R. Establishment of protective immunity against cerebral cryptococcosis by means of an avirulent, non melanogenic *Cryptococcus neoformans* strain. **J. Neuroimmunol.**, Amsterdam, v. 109, n. 2, p. 75-86, Sep 2000.

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

BARRETO DE OLIVEIRA, M.T.; BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; HAGEN, F.; BARONI, F.A.; LAZERA, M.S.; LENGELER, K.B.; HEITMAN, J.; RIVERA, I.N.; PAULA, C.R. *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 42, n. 3, p. 1356-1359, Mar 2004.

¹ De acordo com:

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

- BAVA, A.J.; NEGRONI, R.; BIANCHI, M. Cryptococcosis produced by a urease negative strain of *Cryptococcus neoformans*. **J. Med. Vet. Mycol.**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 87-89, Jan 1993.
- BAUTERS, T.G.; SWINNE, D.; BOEKHOUT, T.; NOENS, L.; NELIS, H.J. Repeated isolation of *Cryptococcus laurentii* from the oropharynx of an immunocompromised patient. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 153, n. 3, p. 133-135, Apr 2002.
- BICANIC, T; HARRISON, T.S. Cryptococcal meningitis. **Br. Med. Bull.**, London, v. 72, n. 1, p. 99-118, Apr 2005.
- BLASI, E.; BROZZETTI, A.; FRANCISCI, D.; NEGLIA, R.; CARDINALI, G.; BISTONI, F.; VIDOTTO, V.; BALDELLI, F. Evidence of microevolution in a clinical case of recurrent *Cryptococcus neoformans* meningoencephalitis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, Berlin, v. 20, n. 8, p. 535-543, Aug 2001.
- BOLANO, A.; STINCHI, S.; PREZIOSI, R.; BISTONI, F.; ALLEGRUCCI, M.; BALDELLI, F.; MARTINI, A.; CARDINALI, G. Rapid methods to extract DNA and RNA from *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 1, n. 3, p. 221-224, Dec 2001.
- BRUESKE, C.H. Proteolytic activity of a clinical isolate of *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 23, n. 3, p. 631-633, Mar 1986.
- BUCHANAN, K.L.; MURPHY, J.W. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 4, n. 1, p. 71-83, Jan/Mar 1998.
- BUTLER, M.J.; DAY, A.W.; HENSON, J.M.; MONEY, N.P. Pathogenic properties of fungal melanins. **Mycologia**, Stanford, v. 93, n. 1, p. 1-8, Jan/Feb 2001.
- BYSTRICKY, S.; PAULOVICOVÁ, E.; MACHOVÁ, E. Synthesis and immunogenicity of polysaccharide protein conjugate composed of galactoglucoylomannan of *C. laurentii*. **FEMS Microbiol. Letters**, Amsterdam, v. 235, n. 2, p. 311-314, Jun 2004.
- CALLEJAS, A.; ORDONEZ, N.; RODRIGUEZ, M.C.; CASTANEDA, E. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, from the environment in Colombia. **Med. Mycol.**, Philadelphia, v. 36, n. 1, p. 341-344, Oct 1998.
- CAMPBELL, L.T.; CARTER, D.A. Looking for sex in the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **FEMS Yeast Res**, Oxford, v. 6, p. 588-598, Apr 2006.
- CAPILLA, J.; MAFFEI, C.M.L.; CLEMONS, K.V.; SOBEL, R.A.; STEVENS, D.A. Experimental systemic infection with *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* in normal and immunodeficient mice. **Med. Mycol.**, Philadelphia, v. 44, n. 7, p. 601-610, Nov 2006.
- CÁRDENAS, C. **Estudio del habitat de las especies de *Cryptococcus* em detritos de diferentes árboles de la ciudad de Cucutá.** 1998. 98f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Facultad de Ciencias – Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 1998.

CASADEVALL, A. Host-microbe interactions: fungi – Recent progress in understanding host-fungal interactions. **Curr. Opin. Microbiol.**, London, v. 3, n. 4, p. 337-338, Aug 2000.

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

CASALI, A.K.; GOULART, L.; ROSA E SILVA, L.M.; RIBEIRO, A.M.; AMARAL, A.A., ALVES, S.H.; SCHRANK, A.; MEYER, W.; VAINSTEIN, M.H. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **FEMS Yeast Res.**, Amsterdam, v. 3, n. 4, p. 405-415, Jun 2003.

CAZZANIGA, R.A. **Características de virulência, morfológicas e genotípicas de amostras clínicas de *Histoplasma capsulatum***. 2006. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Biologia Celular e Molecular). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

CHANG, Y.C.; KWON-CHUNG, K.J. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 14, n. 7, p. 4912-4919, Jul 1994.

CHANG, Y.C.; KWON-CHUNG, K.J. Isolation, characterization, and localization of a capsule-associated gene, *CAP10*, of *Cryptococcus neoformans*. **J. Bacteriol.**, Baltimore, v. 181, n.18, p. 5636-5643, Sep 1999.

CHANG, Y.C.; MILLER, G.F.; KWON-CHUNG, K.J. Importance of a developmentally regulated pheromone receptor of *Cryptococcus neoformans* for virulence. **Infect. Immun.**, Washington, v. 71, n. 9, p. 4953-4960, Sep 2003.

CHANG, Y.C.; PENOYER, L.A.; KWON-CHUNG, K.J. The second gene of *Cryptococcus neoformans*, *CAP64*, is essential for virulence. **Infect. Immun.**, Washington, v. 64, n.6, p. 1977-1983, Jun 1996.

CHATUVERDI, S.; RODEGHIER, B.; FAN, J.; McCLELLAND, C.M.; WICKES, B.L.; CHATUVERDI, V. Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* *MATa* e *MATa* pheromones to determine mating type, ploidy, and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 38, n. 5, p. 2007-2009, May 2000.

CHEN, L.; BLANK, E.; CASADEVALL, A. Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington, v. 3, n. 5, p. 570-574, Sep 1996.

CHEN, S.C.A.; WRIGHT, L.C.; SANTANGELO, R.T.; MULLER, M.; MORAN, V.R.; KUCHEL, P.W.; SORRELL, T.C. Identification of extracellular phospholipase B, lysophospholipase, and acyltransferase produced by *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 65, n. 2, p. 405-411, Feb 1997.

CHRETIEN, F.; LORTHOLARY, O.; KANSAU, I.; NEUVILLE, S.; GRAY, F.; DROMER, F. Pathogenesis of cerebral *Cryptococcus neoformans* infection after fungemia. **J. Infect. Dis.**, Stockholm, v. 186, n. 4, p. 522-530, Aug 2002.

CLANCY, C.J.; NGUYEN, M.H.; ALANDOERFFER, R.; CHENG, S.; ICZKOWSKI, K.; RICHARDSON, M.; GRAYBILL, J.R. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* isolates recovered from persons with AIDS demonstrate a wide range of virulence during murine meningoencephalitis that correlates with the expression of certain virulence factors. **Microbiology**, Washington, v. 152, n. Pt 8, p. 2247-2255, Aug 2006.

CLSI. Clinical And Laboratory Standards Institute/ National Committee For Clinical Laboratory Standards. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standards. Document M27-A2. **Clinical and Laboratory Standard Institute**. 771 E. Lancaster Avenue, Wayne, Pennsylvania 19085, 2002.

COENJAERTS, F.E.J. The sixth international conference on *Cryptococcus* and cryptococcosis (Conference report). **FEMS Yeast Res.**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 312-317, Feb 2006.

CORREA, M.P.S.C.; OLIVEIRA, E.C.; DUARTE, R.R.B.S.; PARDAL, P.P.O.; OLIVEIRA, F.M.; SEVERO, L.C. Criptococose em crianças no Estado do Pará, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 32, n. 5, p. 505-508, Sep/Oct 1999.

CORREA, M.P.S.C.; SEVERO, L.C.; OLIVEIRA, F.M.; IRION, K.; LONDERO, A.T. The spectrum of computerized tomography (CT) findings in central nervous system (CNS) infection due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in immunocompetent children. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 44, n. 5, p. 283-287, Sep/Oct 2002.

COX, G.M.; McDADE, H.C.; CHEN, S.C.; TUCKER, S.C.; GOTTFREDSSON, M.; WRIGHT, L.C.; SORRELL, T.C.; LEIDICH, S.D.; CASADEVALL, A.; GHANNOUM, M.A.; PERFECT, J.R. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. **Mol. Microbiol.**, Boston, v. 39, n.1, p. 166-175, Jan 2001.

COX, G.M.; MUKHERJEE, J.; COLE, G.T.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J.R. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infect. Immun.**, Washington, v. 68, n. 2, p. 443-448, Feb 2000.

CRUZ, M.C.; FOX, D.S.; HEITMAN, J. Calcineurin is required for hyphal elongation during mating and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*. **EMBO J.**, Oxford, v. 20, n. 5, p. 1020-1032, Mar 2001.

CUENCA-ESTRELLA, M; GOMEZ-LOPEZ, A.; MELLADO, E.; BUITRAGO, MJ, MONZON, A.; RODRÍGUEZ-TUDELLA, J.L. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 50, n. 3, p. 917-921, Mar 2006.

CURRIE, B.; SANATI, H.; IBRAHIM, A.S.; EDWARDS, J.E. Jr; CASADEVALL, A.; GHANNOUM, M.A. Sterol compositions and susceptibilities to amphotericin B of environmental *Cryptococcus neoformans* isolates are changed by murine passage. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 39, n. 9, p. 1934-1937, Sep 1995.

DE BERNARDIS, F.; PALLIOLA, E.; LORENZINI, R.; ANTONUCCI, G. Evaluation of the experimental pathogenicity of some *Cryptococcus* species in normal and cyclophosphamide-immunodepressed mice. **Microbiol. Immunol.**, Tokyo, v. 31, n. 5, p. 449-460, May 1987.

DISMUKES, W.E. Management of cryptococcosis. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 17, suppl. 2, p. 5507-5512, Nov 1993.

DIXON, D.M.; POLAK, A. In vivo and in vitro studies with an atypical rhinotropic isolate of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 96, n. 1, p. 33-40, Oct 1986.

DOERING, T.L.; NOSANCHUK, J.D.; ROBERTS, W.K.; CASADEVALL, A. Melanin as a potential cryptococcal defence against microbicidal proteins. **Med. Mycol.**, Philadelphia, v. 37, n. 3, p. 175-181, Jun 1999.

D'SOUZA, C.A.; HAGEN, F.; BOEKHOUT, T.; COX, G.M.; HEITMAN, J. Investigation of the basis of virulence in serotype A strains of *Cryptococcus neoformans* from apparently immunocompetent individuals. **Current Genetics**, New York, v. 46, n. 2, p. 92-102, Aug 2004.

ECHEVERRIA, A.; DURANTE, A.G.; ARECHAVALA, A.; NEGRONI, R. Comparative study of two culture media for the detection of phospholipase activity of *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* strains. **Rev. Iberoam. Micol.**, Bilbao, v. 19, n. 2, p. 95-98, Jun 2002.

EISENMAN, H.C.; CASADEVALL, A.; McCLELLAND, E.E. New insights on the pathogenesis of invasive *Cryptococcus neoformans* infection. **Curr. Infect. Dis. Rep.**, Philadelphia, v. 9, n. 6, p. 457-464, Nov 2007.

ELLERBROEK, P.M.; WALENKAMP, A.M.; HOEPELMAN, A.I.; COENJAERTS, F.E. Effects of the capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans* on phagocyte migration and inflammatory mediators. **Curr. Med. Chem.**, Schiphol, v. 11, n. 2, p. 253-266, Jan 2004.

ELLIS, D.H.; PFEIFFER, T.J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 28, n. 7, p. 1642-1644, Jul 1990.

ESCADÓN, P.; QUINTERO, E.; GRANADOS, D.; HUÉRFANO, S.; RUIZ, A.; CASTAÑEDA, E. Aislamiento de *Cryptococcus gattii* serotipo B a partir de detritus de *Eucalyptus* spp. en Colombia. **Biomedica**, Bogotá, v. 25, n. 3, p. 390-397, Sep 2005.

ESCADÓN, P.; SÁNCHEZ, A.; MARTÍNEZ, M.; MEYER, W.; CASTAÑEDA, E. Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. **FEMS Yeast Res.**, Oxford, v. 6, n. 3, p. 625-635, Mar 2006.

FEDERICI, F. A note on milk clotting ability in the yeast genera *Cryptococcus* and *Rhodotorula*. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v. 52, p. 293-296, 1982.

FELDMESSER, M.; KRESS, Y.; NOVIKOFF, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. **Infect. Immun.**, Washington, v. 68, n. 7, p. 1225-1237, Jul 2000.

FELL, J.W.; STATZELL-TALLMAN. *Cryptococcus* Vuillemin, p. 742-767. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. (ed.). **The yeasts: a taxonomic study**. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1998. 1005p.

FIGUEIREDO, T.P. **Caracterização de amostras de *Cryptococcus* isoladas de pacientes com AIDS: sensibilidade a antifúngicos, tipagem genotípica e determinação molecular do tipo sexual e sorotipo**. 2007. 99 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica: Investigação Biomédica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

FILION, T.; KIDD, S.; AGUIRRE, K. Isolation of *Cryptococcus laurentii* from Canada Goose guano in rural upstate New York. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 162, n. 5, p. 363-368, Nov 2006.

FONSECA, A.; SCORZETTI, G.; FELL, J.W. Diversity in the yeast *Cryptococcus albidus* and related species as revealed by ribosomal DNA sequence analysis. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 46, n. 1, p. 7-24, Jan 2000.

FRANZOT, S.P.; SALKIN, I.F.; CASADEVALL, A.F. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, a separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 37, n. 3, p. 838-840, Mar 1999.

FRANZOT, S.P.; MUKHERJEE, J.; CHERNIAK, R.; CHEN, L.C.; HAMDAN, J.S.; CASADEVALL, A. Microevolution of a standard strain of *Cryptococcus neoformans* resulting in differences in virulence and other phenotypes. **Infect. Immun.**, Washington, v. 66, n. 1, p. 89-97, Jan 1998.

FRASES, S.; SALAZAR, A.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* can utilize the bacterial melanin precursor homogentisic acid for fungal melanogenesis. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 73, n. 2, p. 615-621, Jan 2007.

FRIESE, G.; DISCHER, T.; FUSSLE, R.; SCHMALRECK, A.; LOHMEYER, J. Development of azole resistance during fluconazole maintenance therapy for AIDS-associated cryptococcal disease. **Aids**, London, v. 15, n. 17, p. 2344-2345, Nov 2001.

GARCIA-MARTOS, P.; NOVAL, J.F.; GARCIA-TAPIA, A.; MARIN, P.; PUERTO, J.L.; SEPULVEDA, A. Sensibilidad a antifúngicos de especies de *Cryptococcus* de interés clínico. **Med. Clin.**, Barcelona, v. 119, n. 6, p. 211-213, Nov 2002.

GARELICK, J.M.; KHODABAKHSH, A.J.; LOPEZ, Y.; BAMJI, M.; LISTER, M. Scleral ulceration caused by *Cryptococcus albidus* in a patient with acquired immune deficiency syndrome. **Cornea**, New York, v. 23, n. 7, p. 730-731, Oct 2004.

GEZUELE, E.; CALEGARI, L.; SANABRIA, D.; DAVEL, G. CIVILA, E. Isolation in Uruguay of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a nest of the wasp *Polybia occidentalis*. **Rev. Iberoam. Micol.**, Bilbao, v. 10, n. 1, p. 5-6, Mar 1993.

- GHANNOUM, M.A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 13, n. 1, p. 122-143, Jan 2000.
- GHANNOUM, M.A.; RICE, L.B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clin Microbiol Rev.**, Washington, v. 12, n. 4, p. 501-517, Oct 1999.
- GOLDMAN, D.; LEE, S.C.; CASADEVALL, A. Pathogenesis of pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection in the rat. **Infect. Immun.**, Washington, v. 62, n. 11, 4755-4761, Nov 1994.
- GÓMEZ, B.L.; NOSANCHUK, J.D. Melanin and fungi. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, London, v. 16, n. 2, p. 91-96, Apr 2003.
- HAMILTON, A.J.; GOODLEY, J. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. **Curr. Top. Med. Mycol.**, Barcelona, v. 7, n. 1, p. 19-42, Dec 1996.
- HENRY, K.W.; NICKELS, J.T.; EDLIND, T.D. Upregulation of ERG genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 44, n. 10, p. 2693-2700, Oct 2000.
- HILL, H.Z. The function of melanin or six blind people examine an elephant. **BioEssays**, Cambridge, v. 14, n.1, p. 49-56, Jan 1992.
- HORTA, J.A.; FAGANELLO, J.; ROSA E SILVA, L.K.; OLIVEIRA, L.T.; SANTURIO, J.M.; VAINSTEIN, M.H.; ALVES, S.H. Susceptibility to heat and antifungal agents of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) isolated from *Eucalyptus* spp. in Rio Grande do Sul, Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 1, p. 1-6, Jan/Mar 2005.
- HORTA, J.A.; STAATS, C.C.; CASALI, A.K.; RIBEIRO, A.M.; SCHRANK, I.S.; SCHRANK, A. VAINSTEIN, M.H. Epidemiological aspects of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **Med. Mycol.**, Oxford, v. 40, n. 6, p. 565-571, Dec 2002.
- IDNURM, A.; BAHN, Y.S.; NIELSEN, K.; LIN, X.; FRASER, J.A.; HEITMAN, J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nat. Rev. Microbiol.**, London, v. 3, n. 10, p. 753-764, Oct 2005.
- IGREJA, R.P.; LAZERA, M.S.; WANKE, B.; GALHARDO, M.C.; KIDD, S.E.; MEYER, W. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro. **Med Mycol.**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 229-238, Jun 2004.
- IKEDA, R.; SUGITA, T.; JACOBSON, E.S.; SHINODA, T. Laccase and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.40, n. 4, p. 1214-1218, Apr 2002.
- IKEDA, R.; SUGITA, T.; JACOBSON, E.S.; SHINODA, T. Effect of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. **Microbiol. Immunol.**, Tokyo, v. 47, n. 4, p. 271-277, Apr 2003.

IWATA, K.; YAMASHITA, T.; OHSUMI, M.; BABA, M.; NAITO, N.; TAKI, A.; YAMADA, N. Comparative morphological and biological studies on the itraconazole- and ketoconazole-resistant mutants of *Cryptococcus neoformans*. **J. Med. Vet. Mycol.**, Abingdon, v. 28, n. 1, 77-90, Jan 1990.

JACOBSON, E.S.; TINNELL, S.B. Antioxidant function of fungal melanin. **J. Bacteriol.**, Baltimore, v. 175, n. 21, p. 7102-7104, Nov 1993.

JANBON, G. *Cryptococcus neoformans* capsule biosynthesis and regulation. **FEMS Yeast Res.**, Amsterdam, v. 4, n. 8, p. 765-771, Sep 2004.

JOHNSON, L.B.; BRADLEY, S.F.; KAUFFMAN, C.A. Fungaemia due to *Cryptococcus laurentii* and a review of non-*neoformans* cryptococcaemia. **Mycoses**, Berlin, v. 41, n. 7-8, p. 277-280, Sep/Oct 1998.

KAMALAM, A.; YESUDIAN, P.; THAMBIAH, A.S. Cutaneous infection by *Cryptococcus laurentii*. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v. 97, n. 2, p. 221-223, Aug 1977.

KELLY, S.L.; LAMB, D.C.; TAYLOR, M.; CORRAN, A.J.; BALDWIN, B.C.; POWDERLY, W.G. Resistance to amphotericin B associate with defective sterol D-8-7-isomerase in a *Cryptococcus neoformans* strain from an AIDS patient. **FEMS Microbiol. Letters**, Amsterdam, v. 122, n. 1-2, p. 39-42, Sep 1994.

KHAWCHAROENPORN, T.; APISARNTHANARAK, A.; MUNDY, L.M. Non-*neoformans* cryptococcal infections: a systematic review. **Infection**, Munchen, v. 35, n. 2, p. 51-58, Apr 2007.

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

KOZEL, T.R. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. **Trends Microbiol.**, Cambridge, v. 3, n. 8, p. 295-299, Aug 1995.

KORDOSSIS, T.; AVLAMI, A.; VELEGRAKI, A.; STEFANO, L.; GEORGAKOPOULOS, G.; PAPALAMBROU, C.; LEGAKIS, N. First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and a fatal case of *Cryptococcus albidus* cryptococcaemia in AIDS patients. **Med. Mycol.**, Oxford, v. 36, n. 5, p.335-339, Out 1998.

KOVALENKO, O.K.; BARKALOVA, A.O.; NAHORRNA, S.S. Antiphytoviral activity of capsule substances of *Cryptococcus albidus* yeast. **Mikrobiol. Z.**, Kyiv, v. 67, n. 3, p. 81-84, May-Jun 2005.

KUNOVA, A.; KRcMERY, V. Fungaemia due to thermophilic cryptococci: 3 cases of *Cryptococcus laurentii* bloodstream infections in cancer patients receiving antifungal. **Scand. J. Infect. Dis.**, Stockholm, v. 31, n. 3, p. 328, May/June 1999.

KURIYAMA, T.; WILLIAMS, D.W.; LEWIS, M.A.O. In vitro secreted aspartyl proteinase activity of *Candida albicans* isolated from oral diseases and healthy oral cavities. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 18, n. 6, p. 405-407, Dec 2003.

KUROKAWA, C.S.; SUGIZAKI, M.F.; PERAÇOLI, M.T. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 125-135, May/June 1998.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. (eds.). **The yeasts: a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier Scientific BV, 1998. 1005p.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. **Medical mycology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. 867p.

KWON-CHUNG, K.J.; EDMAN, J.C.; WICKES, B.R. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 60, n. 2, p. 602-605, Feb 1992.

KWON-CHUNG, K.J.; POLACHEK, I.; POPKIN, T.J. Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. **J. Bacteriol.**, Baltimore, v. 150 n. 3, p. 1414-1421, Jun 1982.

KWON-CHUNG, K.J.; VARMA, A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? **FEMS Yeast Res**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 574-587, Jun 2006 .

LABRECQUE, O; SYLVESTRE, D.; MESSIER, S. Systemic *Cryptococcus albidus* infection in a Doberman Pinscher. **J. Vet. Diagn. Invest.**, Columbia, v. 17, n. 6, p. 598-600, Nov 2005.

LACAZ, C.S.; HEINS-VACCARI, E.M.; HERNÁNDEZ-ARRIAGADA, G.I.; MARTINS, E.L.; PREARO, C.A.; CORIM, S.M.; MARTINS, M.A. Primary cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype B, in an immunocompetent patient. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 44, n. 4, p. 225-228, Jul/Aug 2002.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 8.ed. São Paulo: Sarvier, 1991. 695p.

LANGFELDER, K.; STREIBEL, M.; JAHN, B.; HAASE, G.; BRAKHAGE, A.A. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. **Fungal Genet. Biol.**, Orlando, v. 38, n. 2, p. 143-158, Mar 2003.

LATOUCHE, G.N.; SORRELL, T.C.; MEYER, W. Isolation and characterisation of the phospholipase B gene of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **FEMS Yeast Res.**, Amsterdam, v. 2, n. 4, p. 551-561, Dec 2002.

LAZERA, M.S.; CAVALCANTE, M.A.S.; LONDERO, A.T.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M.M.; WANKE, B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Med. Mycol.**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 379-383, Oct 2000.

LAZERA, M.S.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M.M. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **J. Med. Vet. Mycol.**, Oxfordshire, v. 31, n. 4, p. 449-454, Jul/Aug 1993.

LEE, S.C.; DICKSON, D.W.; CASADEVALL, A. Pathology of cryptococcal meningoencephalitis: analysis of 27 patients with pathogenetic implications. **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v. 27, n. 8, p. 839-847, Aug 1996.

LENGELER, K.B.; COX, G.M.; HEITMAN, J. Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating-type locus. **Infect. Immun.**, Washington, v. 69, n. 1, p. 115-122, Jan 2001.

LEVITZ, S.M. Does amoeboid reasoning explain the evolution and a maintenance of virulence factors in *Cryptococcus neoformans*? **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 98, n. 26, p. 14760-14762, Dec 2001.

LEVITZ, S.M.; BOEKHOUT, T. *Cryptococcus*: the once-sleeping giant is fully awake. **FEMS Yeast Res**, Oxford, v. 6, p. 461-462, May 2006.

LEVITZ, S.M.; NONG, S.H.; SEETOO, K.F.; HARRISON, T.S.; SPEIZER, R.A.; SIMONS, E.R. *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. **Infect. Immun.**, Bethesda, v. 67, n. 2, p. 885-890, Feb 1999.

LOEFFLER, J.; STEVENS, D.A.; Antifungal drug resistance. **Clin. Infect. Dis.**, Washington, v. 36, Suppl. 1, S31-41, Jan 2003.

LOISON, J.; BOUCHARA, J.P.; GUIHO, E.; GENTILE, L.; CIMON, B.; CHENNEBAULT, J.M.; CHABASSE, D. First report of *Cryptococcus albidus* septicaemia in an HIV patient. **J. Infect.**, London, v. 33, n. 2, p. 139-140, Sep 1996.

LOPEZ-RIBOT, J.L.; McATEE, R.K.; PEREA, S.; KIRKPATRICK, W.R.; RINALDI, M.G.; PATTERSON, T.F. Multiple resistant phenotypes of *Candida albicans* coexist during episodes of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 43, n. 7, p. 1621-1630, Jul 1999.

MANFREDI, R.; FULGARO, C.; SABBATANI, S.; LEGNANI, G.; FASULO, G. Emergence of amphotericin B-resistant *Cryptococcus laurentii* meningoencephalitis shortly after treatment for *Cryptococcus neoformans* meningitis in a patient with AIDS. **AIDS Patient Care STDS**, Larchmont, v. 20, n. 4, p. 227-232, Apr 2006.

MARTINEZ, L.R.; GARCIA-RIVERA, J.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) strains are more susceptible to heat than *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A) strains. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 39, n. 9, p. 3365-3367, Sep 2001.

MARTINEZ, M.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; KIRCKPATRICK, W.R.; BACHMANN, S.P.; PEREA, S.; RUESGA, M.T.; PATTERSON, T.F. Heterogeneous mechanisms of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates from na HIV-infected patient on continuous fluconazole therapy for oropharyngeal candidosis. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 49, n. 3, p. 515-524, Mar 2002.

MATSUMOTO, M.T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; BAEZA, L.C.; MELHEM, M.S.C.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Genotyping, serotyping and determination of mating-type of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from São Paulo State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 49, n. 1, p. 41-47, Jan-Feb 2007.

MATTSSON, R.; HAEMIG, P.D.; OLSEN, B. Feral pigeons as carriers of *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus uniguttulatus* and *Debaryomyces hansenii*. **Med. Mycol.**, Philadelphia, v. 37, n. 5, p. 367-369, Oct 1999.

MAYSER, P.; LAABS, S.; HEUER, K.U.; GRUNDER, K. Detection of extracellular phospholipase activity in *Candida albicans* and *Rhodotorula rubra*. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 135, n. 3, p. 149-155, Mar 1996.

McCLELLAND, E.E.; PERRINE, W.T.; POTTS, W.K.; CASADEVALL, A. Relationship of virulence factor expression to evolved virulence in mouse-passaged *Cryptococcus neoformans* lines. **Infect. Immun.**, Washington, v. 73, n. 10, p. 7047-7050, Oct 2005.

McCURDY, M.D.; MORROW, J.D. Ventriculitis due to *Cryptococcus uniguttulatus*. **South. Med. J.**, Birmingham, v. 94, n. 1, p. 65-66, Jan 2001.

McPHERSON, G. **Statistical in scientific investigation: its basis, application, and interpretation**. New York: Springer Verlag, 1990, 668p.

MELLADO, E.; DIAS-GUERRA, T.M.; CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J.L. Identification of two different 14-alpha sterol demethylase-related genes (*cyp51A* and *cyp51B*) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 39, n. 7, p. 2431-2438, Jul 2001.

MEYER, W.; CASTAÑEDA A.; JACKSON, S.; HUYNH, M.; CASTAÑEDA, E.; and the IberoAmerican Cryptococcal Study Group. Molecular typing of Iberoamerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 9, n. 2, p. 189-195, Feb 2003.

MEYER, W.; MARSZEWSKA, K.; AMIRMOSTOFINA, M.; IGREJA, R.P.; HARDTKE, C.; METHLING, K.; VIVIANI, M.A.; CHINDAMPORN, A.; SUKROONGREUNG, S.; JOHN, M.A.; ELLIS, D.H.; SORRELL, T.C. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA - a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 20, n. 8, p. 1790-1799, Jun 1999.

MEYER, W.; MITCHELL, T.G.; FREEMAN, E.Z.; VILGALYS, R. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 31, n. 9, p. 2274-2280, Sep 1993.

MEYER, W.; MITCHELL, T.G. Polymerase chain reaction fingerprinting in fungi using single primers specific to minisatellites and simple repetitive DNA sequences: strain variation in *Cryptococcus neoformans*. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 16, n. 9, p. 1648-1650, Sep 1995.

MISSALL, T.A.; MORAN, J.M.; CORBETT, J.A.; LODGE, J.K. Distinct stress responses of two functional laccases in *Cryptococcus neoformans* are revealed in the absence of thiol-specific antioxidant Tsa 1. **Euk. Cell.**, Washington, v. 4, n. 1, p. 202-208, Jan 2005.

MITCHELL, A.P. Updated view of *Cryptococcus neoformans* mating type and virulence. **Infect. Immun.**, Washington, v. 71, n. 9, p. 4829-4830, Sep 2003.

MITCHELL, T.G.; PERFECT, J.R. Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after the Discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 8, n. 4, p. 515-548, Oct 1995.

MONTENEGRO, H.; PAULA, C.R. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. **Med. Mycol.**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 385-390, Oct 2000.

NARAYAN, S.; BATTI, K.; COLLOBY, P.; TAN, C.Y. Cutaneous *Cryptococcus* infection due to *C. albidus* associated with Sezary Syndrome. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v. 143, n. 3, 632-634, Sep 2000.

NISHIKAWA, M.M.; LAZERA, M.S.; BARBOSA, G.G.; TRILLES, L.; BALASSIANO, B.R.; MACEDO, R.C.L.; BEZERRA, C.C.F.; PÉREZ, M.A.; CARDARELLI, P.; WANKE, B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 41, n. 1, p. 73-77, Jan 2003.

NOVERR, M.C.; COX, G.M.; PERFECT, J.R.; HUFFNAGLE, G.B. Role of *PLB1* in pulmonary inflammation and cryptococcal eicosanoid production. **Infect. Immun.**, Washington, v. 71, n. 3, p. 1538-1547, Mar 2003.

ODOM, A.; MUIR, S.; LIM, E.; TOFFALETTI, D.L.; PERFECT, J.; HEITMAN, J. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **EMBO J.**, Oxford, v. 16, n. 10, p. 2576-2589, May 1997.

OHKUSU, M.; TANGENAN, N.; TAKEO, K.; KISHIDA, E.; OHKUBO, M.; AOKI, S.; NAKAMURA, K.; FUJII, T.; SIQUEIRA, I.C.; MACIEL, E.A.P.; SAKABE, S.; ALMEIDA, G.M.D.; HEINS-VACCARI, E.M.; LACAZ, C.S. Serotyping, mating type and ploidy of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from patients in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 44, n. 6, p. 299-302, Nov/Dec 2002.

OKABAYASHI, K.; KANO, R.; WATANABE, T.; HASEGAWA, A. Expression of capsule-associated genes of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 160, n. 1, p. 1-7, Aug 2005.

OKABAYASHI, K.; KANO, R.; WATANABE, T.; HASEGAWA, A. Serotypes and mating types of clinical isolates from feline cryptococcosis in Japan. **J. Vet. Med. Sci.**, Tokyo, v. 68, n. 1, p. 91-94, Jan 2006.

OLSZEWSKI, M.A.; NOVERR, M.C.; CHEN, G.; TOEWS, G.B.; COX, G.M.; PERFECT, J.R.; HUFFNAGLE, G.B. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. **Am. J. Pathol.**, Philadelphia, v. 161, n. 5, p. 1761-1771, May 2004.

PAL, M. Pathogenicity of environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in murine model. **Rev. Iberoam. Micol.**, Barcelona. 22, n. 2, p. 129, Jun 2005.

PAPPALARDO, M.C.S.M.; MELHEM, M.S.C. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 45, n. 6, p. 299-305, Nov/Dec 2003.

PAUGAM, A.; DUPOUY-CAMET, J.; BLANCHE, P.; GANGNEUX, J.P.; TOURTESCHAEFER, C.; SICARD, D. Increased fluconazole resistance of *Cryptococcus neoformans* isolated from a patient with AIDS and recurrent meningitis. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 19, n. 5, p. 975-976, Nov 1994.

PAVLOVA, K.; GRIGORAVA, D.; HRISTOZOVA, T.; ANGELOV, A. Yeast strains from Livingston Island, Antarctica. **Folia Microbiol.**, Praha, v. 46, n. 5, p. 397-401, Nov 2001.

PEDROSO, R.S. **Cryptococcus spp de fontes ambientais em Ribeirão Preto: ocorrência, fatores de virulência e sensibilidade aos antifúngicos.** 2004. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas: Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

PEDROSO, R.S.; COSTA, K.R.C.; FERREIRA, J.C.; CANDIDO, R.C. Evaluation of melanin production by *Cryptococcus* species in four different culture media. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 40, n. 5, p. 566-568, Sep-Oct 2007.

PEDROSO, R.S.; FERREIRA, J.C.; CANDIDO, R.C. Atividades das enzimas fosfolipase e proteinase por cepas de *Cryptococcus* spp isoladas do ambiente. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 2, p. 62B, Abr 2004.

PEDROSO, R.S.; FERREIRA, J.C.; CANDIDO, R.C. In vitro susceptibility to antifungal agents of environmental *Cryptococcus* spp. isolated in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 3, p. 239-243, May 2006.

PEDROSO, R.S.; FERREIRA, J.C.; CANDIDO, R.C. The isolation and characterization of virulence factors of *Cryptococcus* spp. from saprophytic sources in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Microbiol. Res.**, Jena, Apr 2007. No prelo.

PERFECT, J.R.; COX, G.M. Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Drug Resist. Updat.**, Edinsburg, v. 2, n. 4, p. 259-269, Aug 1999.

PFEIFFER, T.J.; ELLIS, D.H. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from California. **J. infect. Dis.**, Chicago, v. 163, n. 4, p. 929-930, Apr 1991.

PFEIFFER, T.J.; ELLIS, D.H. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tereticornis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, Oxford, v. 30, n. 5, p. 407-408, Oct 1992.

PINTI, M.; ORSI, C.F.; GIBELLINI, L.; ESPOSITO, R.; COSSARIZZA, A.; BLASI, E.; PEPPOLINI, S.; MUSSINI, C. Identification and characterization of an aspartil protease from *Cryptococcus neoformans*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 581, n. 20, p. 3882-3886, Jul 2007.

POLACHECK, I.; HEARING, V.J.; KWON-CHUNG, K.J. Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 150, n. 3, p. 1212-1220, Jun 1982.

POLACHECK, I.; KWON-CHUNG, K.J. Melanogenesis in *Cryptococcus neoformans*. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v. 134, n. 4, p. 1034-1041, Apr 1988.

POSTERARO, B.; SANGUINETTI, M.; SANGLARD, D.; LA SORDA, M.; BOCCIA, S.; ROMANO, L.; MORACE, G.; FADDA, G. Identification and characterization of a *Cryptococcus neoformans* ATP binding cassette (ABC) transporter-encoding gene, *CnAFRII*, involved in the resistance to fluconazole. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 357-371, Jan 2003.

PRASAD, R.; DE WERGIFOSSE, P.; GOFFEAU, A.; BALZI, E. Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, *CDRI*, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. **Curr. Genet.**, New York, v. 27, n. 4, p. 320-329, Mar 1995.

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

RHODES, J.C.; POLACHECK, I.; KWON-CHUNG, K.J. Phenoloxidase activity and virulence in isogenic strains of *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 36, n. 3, p. 1175-1184, Jun 1982.

RHODES, J.C. Virulence factors in fungal pathogens. **Microbiol. Sci.**, Oxford, v. 5, n. 8, p. 252-254, Aug 1988.

RHODES, J.C.; KWON-CHUNG, K.J.; POPKIN, T.J. Ultrastructure of the septal complex in hyphae of *Cryptococcus laurentii*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 145, n. 3, p. 1410-1412, Mar 1981.

RICIPUTO, R.M.; OLIVERI, S.; MICALI, G.; PAPUPPO, A. Phospholipase activity in *Malassezia furfur* pathogenic strains. **Mycoses**, Berlin, v. 39, n. 5-6, p. 233-235, May/Jun 1996.

RODERO, L.; MELLADO, E.; RODRIGUEZ, C.; SALVE, A.; GUELFAND, L.; CAHN, P.; CUENCA-ESTRELLA, M.; DAVEL, G.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. G484S amino acid substitution in lanosterol 14-alfa demethylase (*ERG11*) is related to fluconazole resistance in a recurrent *Cryptococcus neoformans* clinical isolate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 47, n. 11, p. 3653-3656, Nov 2003.

ROSARIO, I.; HERMOSO DE MENDOZA, M.; DENIZ, S.; SORO, G.; ALAMO, I.; ACOSTA, B. Isolation of *Cryptococcus* species including *C. neoformans* from cloaca of pigeons. **Mycoses**, Berlin, v. 48, n. 6, p. 421-424, Nov 2005.

- ROSAS, A.L.; CASADEVALL, A. Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 153, n. 1, p. 565-572, Nov 1997.
- RUANE, P.J.; WALKER, L.J.; GEORGE, W.L. Disseminated infection caused by urease-negative *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 26, n. 10, p. 2224-2225, Oct 1988.
- RUMA-HAYNES, P.; BROWNLEE, A.G.; SORRELL, T.C. A rapid method for detecting extracellular proteinase activity in *Cryptococcus neoformans* and a survey of 63 isolates. **J. Med. Microbiol.**, Edinburgh, v. 49, n. 8, p. 733-737, Aug 2000.
- RÜCHEL, R.; TEGELLER, R.; TROST, M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia**, Edinburgh, v. 20, n. 3, p. 233-244, Sep 1982.
- SAAG, M.S.; GRAYBILL, R.J.; LARSEN, R.A.; PAPPAS, P.G.; PERFECT, J.R.; POWDERLY, W.G.; SOBEL, J.D. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. **Clin. Infect. Dis.**, Washington, v. 30, n. 4, p. 710-718, Apr 2000.
- SALAS, S.D.; BENNETT, J.E.; KWON-CHUNG, K.J.; PERFECT, J.R.; WILLIAMSON, P.R. Effect of the laccase gene, *CNLAC 1*, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. **J. Exp. Med.**, New York, v. 184, n. 2, p. 377-386, Aug 1996.
- SALKOWSKI, C.A.; BALISH, E. Cutaneous cryptococcosis in athymic and beige-athymic mice. **Infect. Immun.**, Washington, v. 59, n. 5, p. 1785-1789, May 1991.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd Ed. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001.
- SANGLARD, D.; ISCHER, F.; KOYMANS, L.; BILLE, J. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14- α -demethylase (*CYP51A1*) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agent. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 42, n. 2, p. 241-253, Feb 1998.
- SANGLARD, D.; KUCHLER, K.; ISCHER, F.; PAGANI, J.L.; MONOD, M.; BILLE, J. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 39, n. 11, p. 2378-2386, Nov 1995.
- SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LA SORDA, M.; TORELLI, R.; FIORI, B.; SANTANGELO, R.; DELOGU, G.; FADDA, G. Role of *AFRI*, an ABC transporter-encoding gene, in the in vivo response to fluconazole and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 74, n. 2, p. 1352-1359, Feb 2006.
- SANTANGELO, R.T.; NOURI-SORKHABI, M.H.; SORRELL, T.C.; CAGNEY, M.; CHEN, S.C.; KUCHEL, P.W.; WRIGHT, L.C. Biochemical and functional characterization of secreted phospholipases from *Cryptococcus neoformans* in their naturally occurring state. **J. Med. Microbiol.**, London, v. 48, n. 8, p. 731-740, Aug 1999.

SANTANGELO, R.; ZOELLNER, H.; SORRELL, T.; WILSON, C.; DONALD, C.; DJORDJEVIC, J.; SHOUNAN, Y.; WRIGHT, L. Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model. **Infect. Immun.**, Washington, v. 72, n. 4, p. 2229-2239, Apr 2004.

SCHMIEL, D.H.; MILLER, V.L. Bacterial phospholipases and pathogenesis. **Microbes Infect.**, New York, v. 1, n. 13, p. 1103-1112, Nov 1999.

SEGAL, E.; BAUM, G.L. **Pathogenic yeasts and yeasts infections**. CRC Press: Boca Raton, 1994. 238p.

SEVERO, L.C.; BERTA-E-ZARDO, I.; LONDERO, A.T. Cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Rev. Iberoam. Micol.**, Bilbao, v. 18, n. 4, p. 200-201, Dec 2001.

SHANKAR, E.M.; KUMARASAMY, N.; BELLA, D.; RENUKA, S.; KOWNHAR, H.; SUNITI, S.; RAJAN, R.; RAO, U.A. Pneumonia and pleural effusion due to *Cryptococcus laurentii* in a clinically proven case of AIDS. **Can. Respir. J.**, Oakville, v. 13, n. 5, p. 275-278, Jul/Aug 2006.

SIEGEL, S. **Nonparametric statistics for the behavioral sciences**. International student edition. Kogakusha, Japan: MacGraw-Hill, 1959, 312p.

SILVA, E.G.; BARONI, F.A.; VIANI, F.C.; RUIZ, L.S.; GANDRA, R.F.; AULER, M.E.; DIAS, A.L.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R. Virulence profile of strains of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* evaluated by experimental infection in BALB/c mice and correlation with exoenzyme activity. **J. Med. Microbiol.**, Edinburgh, v. 55, n. Pt 2, p. 139-142, Feb 2006a.

SILVA, E.G.; PAULA, C.R.; BARONI, F.A.; CURY, A.E.; VIANI, F.C.; AULER, M. E.; DIAS, A.L.T.; RUIZ, L.S.; MATSUMOTO, F.E.; GAMBALE, V. Susceptibility to antifungal agents of *Cryptococcus neoformans*: evaluation before and after experimental infection in mice. **The 16th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology**; 2006 June 25-29, Paris, France, 2006b.

SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; IKEDA, R.; NAKASE, T.; SHINODA, T. Intraspecies diversity of *Cryptococcus albidus* isolated from humans as revealed by sequences of the internal transcribed spacer regions. **Microbiol. Immunol.**, Tokyo, v. 45, n. 4, p. 291-297, Apr 2001.

SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; IKEDA, R.; NAKASE, T.; SHINODA, T. Intraspecies diversity of *Cryptococcus laurentii* as revealed by sequences of internal transcribed spacer regions and 28S rRNA gene and taxonomic position of *Cryptococcus laurentii* clinical isolates. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 38, n. 4, p. 1468-1471, Apr 2000.

STAIB, F. Das Verhalten von *Candida albicans*- und *Cryptococcus neoformans*-Stämmen gegenüber human-serum-proteinen. **Mycopathol. Mycol.**, The Hague, v. 26, 209-224, 1964.

TAKASHIMA, M.; SUGITA, T.; SHINODA, T.; NASASE, T. Three new combinations from the *Cryptococcus laurentii* complex: *Cryptococcus aureus*, *Cryptococcus carnescens* and *Cryptococcus peneaus*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, v. 53, n. 4, p. 1187-1194, Jul 2003.

TANAKA, E.; ITO-KUWA, S.; NAKAMURA, K.; AOKI, S.; VIDOTTO, V.; ITO, M. Comparisons of the laccase gene among serotypes and melanin-deficient variants of *Cryptococcus neoformans*. **Microbiol. Immunol.**, Tokyo, v. 49, n. 3, p. 209-217, Mar 2005.

VANCANNEYT, M.; COOPMAN, R.; TYTGAT, R.; HENNEBERT, G.L.; KERSTERS, K. Whole-cell protein patterns, DNA base compositions and coenzyme Q types in the yeast genus *Cryptococcus* Kützing and related taxa. **Syst. Appl. Microbiol.**, Stuttgart, v. 17, n. 1, p. 65-75, Jan 1994.

VANDEN BOSSCHE, H.; MARICHAL, P.; ODDS, F.C.; LE JEUNE, L.; COENE, M.C. Characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 36, n. 12, p. 2602-2610, Dec 1992.

VENKATESWARLU, K.; TAYLOR, M.; MANNING, N.J.; RINALDI, M.G.; KELLY, S.L. Fluconazole tolerance in clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 41, n.4, p. 748-751, Apr 1997.

VIDOTTO, V.; SINICCO, A.; DI FRAIA, D.; CARDAROPOLI, S.; AOKI, S.; ITO-KUWA, S. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 136, n. 3, p. 119-123, Mar 1996.

VLCHKOVA-LASHKOSKA, M.; KAMBEROVA, S.; STAROVA, A.; GOLEVA-MISHEVSKA, L.; TSATSA-BILJANOVSKA, N.; JANEVSKA, V.; PETROVSKA, M. Cutaneous *Cryptococcus laurentii* in a human immunodeficiency virus-negative subject. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, Amsterdam, v. 18, n. 1, p. 99-100, Jan 2004.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. **Infect. Immun.**, Washington, v. 63, n. 8, p. 3131-3136, Aug 1995.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Susceptibility of melanized and non-melanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. **Infect. Immun.**, Washington, v. 62, n. 7, p. 3004-3007, Jul 1994a.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 60, n. 10, p. 3864-3866, Oct 1994b.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-dopa decreases its susceptibility to amphotericin B. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 38, n. 11, p. 2646-2650, Nov 1994c.

WHITE, T.C.; MARR, K.A.; BOWDEN, R.A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 11, n. 2, p. 382-402, Apr 1998.

WICKES, B.L.; KWON-CHUNG, K.J. Genetic basis of pathogenicity in *Cryptococcus neoformans*, p. 25-49. In: **Fungal Pathogenesis: Principles and Clinical Applications**. Marcel Dekker, New York, 2002. 762 p.

WILES, S.; WILLIAM, P.H.; FRANKEL G.; ROBERTSON, B. Modelling infectious disease – time to think outside the box? **Nat. Rev. Microbiol.**, London, v. 4, n. 4, p. 307-312, Apr 2006.

WILLIAMSON, M.; SAMARANAYAKE, L.P.; MacFARLANE, T.W. Phospholipase activity as a criterion for biotyping *Candida albicans*. **J. Med. Vet. Mycol.**, Oxfordshire, v. 24, n. 5, p.415-417, Oct 1986.

WILLIAMSON, P.R. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. **J. Bacteriol.**, Baltimore, v. 176, n. 3, p. 656-664, Feb 1994.

WITT, W.; MERTSCHING, A.; KONIG, E. Secretion of phospholipase B from *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 795, n. 1, p. 117-124, Aug 1984.

ZAK, O.; O'REILLY, T. Animal infection models and ethics – the perfect infection model. **J. Antimicrob. Chemother.**, New York, v. 31, suppl. D, p. 193-205, May 1993.

ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. **Biol. Proced. Online**, Waterloo, v. 6, n. 1, p. 10-15, Mar 2004.