



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DE FATORES DE RESISTÊNCIA AO FLUCONAZOL EM**  
**MODELO MURINO DE CRIPTOCOCOSE CAUSADA POR**  
***CRYPTOCOCCUS GATTII***

**ALIDE CAROLINE LIMA FONTES**

**Belo Horizonte**

**2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

**ALIDE CAROLINE LIMA FONTES**

Avaliação de fatores de resistência ao fluconazol em modelo murino de  
criptococose causada por *Cryptococcus gattii*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, para obtenção do grau de Doutor (a) em Ciências Biológicas (Microbiologia).

**Orientador:** Prof. Dr. Daniel de Assis Santos  
(Departamento de Microbiologia)

**Belo Horizonte**

**2016**

AVALIAÇÃO DE FATORES DE RESISTÊNCIA AO FLUCONAZOL EM MODELO  
MURINO DE CRIPTOCOCOSE CAUSADA POR *CRYPTOCOCCUS GATTII*

**ALIDE CAROLINE LIMA FONTES**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Daniel de Assis Santos

Tese de doutorado apresentada e aprovada no dia 24 de agosto de 2016, pela Banca Examinadora, composta dos seguintes membros:

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Susana Johann (ICB - UFMG)

Profa. Dra. Raquel Virgínia Rocha Vilela (FAFAR - UFMG)

Profa. Dra. Rachel Basques Caligiorne (Santa Casa - Belo Horizonte)

Profa. Dra. Gabriella Freitas Ferreira (Departamento de Farmácia - UFJF)

SUPLENTES:

Profa. Dra. Maria Aparecida de Resende Stoianoff (ICB - UFMG)

Prof. Dr. Rodrigo Assunção de Holanda (UNICEUMA)

Belo Horizonte

2016

Fim de um grande começo!  
(Maria Ângela S. Lima Fontes)

*Dedico*

*A Arnóbio e Ângela, meus pais, sempre presentes, apesar da distância que nos separam, e a meu irmão, Henrique, pessoa muito especial em minha vida. A eles por todo amor a mim dedicado durante todos os momentos dessa trajetória.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, a quem entreguei meus passos, e que não permitiu que eu desistisse dos meus sonhos, mesmo que parecesse impossível chegar ao fim.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em especial ao Departamento de Microbiologia e a Pós-Graduação em Microbiologia, que foi meu lar na maioria desses quatro anos, e me proporcionou os alicerces necessários para concretização deste trabalho.

À Fundação e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro no decorrer deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Daniel, meu orientador, pela atenção, paciência, incentivo e amizade demonstrada, tornando a pesquisa mais prazerosa e plantando a certeza de que este trabalho poderia se tornar realidade e que há ainda muito por vir.

À Profa. Dr. Cidinha, pelo incentivo, atenção, apoio e pelo conhecimento transmitido, sempre estimulando o meu potencial.

À Profa. Marilene Henning Vainstein, pelo incentivo, oportunidade e valiosa contribuição neste trabalho, ao Prof. Dr. Charley Staats pela atenção e auxílio nas análises, e a todo o pessoal do Laboratório de Biologia de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica (Lab220) do CBiot da UFRGS, que foram além da pesquisa, fizeram parte da minha vida.

Ao Prof. Dr. Jeronimo Ruiz, pela contribuição na geração dos dados de proteínas, e a todos da Informática de Biosistemas (Fiocruz Minas), em especial a Grace, sem ela esta análise estaria ainda mais distante de acontecer.

À banca examinadora, por aceitarem meu convite, e pela certeza das grandes contribuições que enriquecerão ainda mais o meu trabalho.

Aos colegas da pós-graduação, por toda colaboração nas disciplinas, nos experimentos mais difíceis e trabalhosos como os eternos sacrifícios e fagocitoses, e também pelo ótimo convívio dentro e fora dos laboratórios, em especial à equipe do Chá da tarde que foram além do trabalho, hoje fazem parte da minha vida.

Aos amigos de longas datas, pela força, amizade, companheirismo e alegre convívio que me proporcionaram ótimos momentos, mesmo que escassos durante todos esses anos, por um objetivo muito especial.

A meus queridos familiares por aceitarem minhas eternas idas e vindas, e sempre acreditarem que toda a saudade é para um bem maior. Obrigada por todo incentivo, apoio e muito carinho nos momentos mais difíceis para chegar a essa conquista.

A todos que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho, e da minha evolução como pessoa, mas que por diversas razões não fazem mais parte do meu presente.

E por fim, ao meu conterrâneo Alceu Valença e suas musicas, que tornaram a escrita da tese mais prazerosas *nas tardes de um domingo azul* (La belle de jour), e em todas as noites e madrugadas que se seguiram.

## LISTA DE ABREVIATURAS

5FC	5-flucitosina
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ABS	Absorbância
AFR	<i>Antifungal resistance</i>
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AMB	Anfotericina B
ANOVA	Análise de variância
Cbiot	Centro de Biotecnologia
cDNA	DNA complementar
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CHAPS	(3-((3-cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propanesulfonate)
CIM	Concentração inibitória mínima
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DC	Células dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreito
eEF-2	Fator de alongação traducional
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERRO	Espécies reativas de oxigênio
FLC	Fluconazol
GalXM	Galactoxilomanana
GXM	Glucuronoxilomanana
HA	Ácido hialurônico
HCl	Ácido clorídrico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSP	Proteínas de choque térmico ( <i>Heat-shock protein</i> )
IFN	Interferon
IFN-I	Interferon do tipo I
IFN $\alpha$	Interferon alfa



IFN $\beta$	Interferon beta
IL	Interleucina
IRIS	Síndrome inflamatória de reconstituição imune
Kb	Kilobase
LC-ESI-MS	Cromatografia líquida acoplada a ionização por eletrospray e espectrometria de massas
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MDR	<i>Multiple drug resistance</i>
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MPs	Manoproteínas
MS	Espectrometria de massa
MS/MS	Espectrometria de massas em tandem
MX	Genes induzidos por interferon
m/z	Taxa de massa/carga
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de Amônio
NO	Óxido nítrico
OD	Densidade óptica
pb	Pares de base
PBS	Salina fosfato tamponada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDR	<i>Pleiotropic Drug Resistance</i>
PS	Polissacarídica
qPCR	PCR quantitativa (PCR em tempo real)
Q-ToF	<i>Quadrupole-time-of-flight</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
SDA	Ágar dextrose Sabouraud
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TCA	Ácido tricloroacético

TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UPLC	Cromatografia líquida de ultra performance
YPD	Extrato de levedura, peptona, dextrose
$\mu\text{L}$	Microlitro

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Ciclo natural sugerido de <i>Cryptococcus gattii</i> e eventos que levam à criptococose.	20
Figura 2-	Esquema da filogenia do complexo <i>C. neoformans-C. gattii</i> .	24
Figura 3-	Relatos mundiais de <i>Cryptococcus gattii</i> de isolados clínicos humano e veterinário, e de fontes ambientais.	25
Figura 4-	Estruturas dos componentes da cápsula polissacarídica de <i>Cryptococcus</i>	28
Figura 5-	Invasão ao sistema nervoso central.	30
Figura 6-	Mecanismo de Ação de Fluconazol	32
Figura 7-	Representação esquemática da via biossintética do ergosterol e inibição pelo fluconazol	36
Figura 8-	Mecanismo de ação das bombas de efluxo	37
Figura 9-	Via de sinalização de IFN alfa e IFN beta	39
Figure 1-	Survival curve (A), Colony-forming units (CFU) per gram of tissue (B), Histopathological sections	48
Figure 2-	Expression of IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ and MX2 in the lung (A) and brain (B) from mice infected with <i>Cryptococcus gattii</i>	49
Figure 3-	Flow cytometry analysis of J774.A1 macrophage infection after 2h of interaction with FITC-labeled <i>Cryptococcus gattii</i> cells	49
Figure 4-	The Minimum inhibitory concentration - MIC (mg/L) of fluconazole based on the percentage of colonies of for <i>C. gattii</i>	49
Figure 5-	Laccase activity (A), melanization (B) and capsule size (C, D, E) of <i>C. gattii</i> L27/01 cells	50
Figure 6-	Expression of PDR11 and MDR1, ERG11, UXS1 and CAP59 in colonies recovered	50
Figura 16-	Representação gráfica das curvas de sobrevivência dos camundongos imunossuprimidos não infectados e após infecção com <i>C. gattii</i>	59
Figura 17-	Curvas de desempenho no comportamento de animais não infectados e após infecção com <i>C. gattii</i>	60
Figura 18-	Unidades formadoras de colônias por gramas de tecido de animais infectados com $1 \times 10^6$ células de <i>C. gattii</i>	62

Figura 19-	Taxa de fagocitose dos grupos infectados com <i>C. gattii</i> L27-01 a partir de macrófagos de animais imunocompetente e imunossuprimidos	63
Figura 20-	Índice de proliferação intracelular entre os grupos de animais imunocompetentes e imunossuprimidos infectados por <i>C. gattii</i>	63
Figura 21-	Percentual de colônias de <i>C. gattii</i> recuperadas dos cérebros (a) e pulmões (b) dos camundongos para cada valor de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ).	64
Figura 22-	Expressão dos genes envolvidos na biossíntese da cápsula CAP59 (a) e UXS1 (b) de <i>C. gattii</i>	66
Figura 23-	Expressão dos genes associados a bombas de efluxo e síntese de ergosterol PDR1 (a) e MDR1 (b) e ERG11 (c) de <i>C. gattii</i>	67
Figura 24-	Gel SDS PAGE 1DE	77
Figura 25-	Distribuição de proteínas encontradas em cada condição do isolado de <i>C. gattii</i> :	78

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Fatores de virulencia de <i>C. gattii</i> e suas funções adaptado de DIXIT <i>et al</i> , 2009	26
Table 1-	Sequences of the primers used in this study for qPCR of genes from mice (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ and MX2) and from <i>C. gattii</i> (MDR1, PDR11, ERG11, UXS1 and CAP59)	46
Tabela 3-	Quantificação das proteínas de <i>C. gattii</i> pelo método de Bradford	76
Tabela 4-	Identificação das proteínas observadas em todas as condições, e sua frequência no proteoma	79
Tabela 5-	Proteínas partilhadas entre os grupos	80

## SUMÁRIO

### RESUMO

### ABSTRACT

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	17
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	18
<b>2.1 Criptococose</b>	18
<b>2.2 Gênero <i>Cryptococcus</i></b>	21
2.2.1. <i>Cryptococcus gattii</i>	22
<b>2.3 Fatores de virulência de <i>Cryptococcus</i></b>	25
<b>2.4 Terapia antifúngica</b>	30
<b>2.5 Resistência aos antifúngicos</b>	34
2.5.1. Mecanismos de resistência	35
<b>2.6 Resposta inflamatória do hospedeiro na criptococose</b>	38
<b>3. OBJETIVOS</b>	42
<b>3.1 Objetivo geral</b>	42
<b>3.2 Objetivos específicos</b>	42
<b>4. CAPÍTULO 1-A subdose of fluconazole alters the virulence of <i>Cryptococcus gattii</i> during murine cryptococcosis and modulates type I interferon expression</b>	43
<b>5. CAPÍTULO 2- Efeito da imunossupressão em camundongos C57BL/6 infectados com <i>Cryptococcus gattii</i> na resposta a criptococose</b>	54
<b>6. CAPÍTULO 3- Estudo do proteoma de <i>C. gattii</i> recuperado de modelo murino</b>	71
<b>7. CONCLUSÃO</b>	81
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	82
<b>ANEXO 1 – Decisão do CEUA</b>	i
<b>ANEXO 2 - Total de proteínas identificadas para cada grupo estudado</b>	ii
<b>ANEXO 3 – Atividades desenvolvidas durante a Pós-Graduação - Artigos</b>	iv
<b>ANEXO 4 – Atividades desenvolvidas durante a Pós-Graduação - Resumos</b>	vii

## RESUMO

A criptococose é uma infecção sistêmica causada por fungo leveduriforme do gênero *Cryptococcus* spp., que pode se mostrar como uma colonização pulmonar assintomática, até mesmo como uma meningite ou uma doença disseminada. *Cryptococcus gattii*, tipicamente encontrado em regiões de clima tropical e subtropical, é usualmente causador da doença em hospedeiros imunocompetentes. A cápsula polissacarídica é importante para a sobrevivência do micro-organismo no ambiente e no hospedeiro e é considerado um importante fator de virulência. A disponibilidade de antifúngicos para a terapia dessa doença é relativamente pequena e confere certa toxicidade, ao mesmo tempo, a incidência das infecções causadas por linhagens resistentes aumentou. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o desenvolvimento de resistência ao fluconazol por *C. gattii* durante a infecção em modelo murinho, os efeitos na progressão da criptococose em modelo de imunossupressão, e a identificação de proteínas nos isolados de *C. gattii* após a infecção. A progressão da doença foi avaliada por alterações comportamentais dos animais, quantificação de unidades formadoras de colônias nos órgãos e expressão de interferons do tipo I. Após recuperação das colônias fúngicas, foi avaliada a expressão dos genes que codificam bombas de efluxo, do gene ERG11 e de genes responsáveis pela síntese e montagem da cápsula polissacarídica. Das colônias recuperadas também foram extraídas as proteínas para análise de espectrometria de massas. O modelo de imunossupressão foi induzido por dexametasona. No presente estudo, foi evidenciado que a subdose de fluconazol altera os fatores de virulência do fungo, diminui a susceptibilidade ao fluconazol, altera a resposta inflamatória do hospedeiro e aumenta a morbidade de camundongos infectados com *C. gattii*. O tratamento com fluconazol, mesmo em hospedeiro imunossuprimido, aumenta a sobrevivência do mesmo. E que a imunossupressão contribuiu para uma redução da migração da levedura para o SNC nos animais, provavelmente pela menor atividade fagocítica e reduzida atividade fungicida de macrófagos provenientes desses animais. Como conclusão, nós fornecemos novas perspectivas sobre o tratamento com fluconazol da criptococose. O conhecimento da forma pela qual os fatores de resistência ao fluconazol afetam a virulência de *C. gattii* e a resposta imune do hospedeiro é fundamental para entender o impacto clínico da resistência antifúngica na criptococose. Devido ao crescente número de casos e de óbitos pela criptococose, estudos envolvendo *C. gattii* e fatores que abordam a resistência antifúngica devem ser uma prioridade de pesquisa.

Palavras-chave: micose sistêmica; fatores de virulência; susceptibilidade; tratamento; resposta inflamatória; imunossupressão

## ABSTRACT

Cryptococcosis is an invasive infection caused by yeast-like fungus of the genera *Cryptococcus* spp., which can show up as an asymptomatic pulmonary colonization, even as meningitis or disseminated disease. *Cryptococcus gattii*, typically found in tropical and subtropical climates, is usually cause disease in immunocompetent hosts. The polysaccharide capsule is important for the survival of the microorganism in the environment and in the host and is considered an important virulence factor. The availability of antifungal therapy for this disease is relatively small, and providing some toxicity, while the incidence of infections caused by resistant strains increased. Thus, the objective of this study is to evaluate the development of resistance to fluconazole by *C. gattii* during infection in a murine model, the effects on the progression of cryptococcosis in immunosuppression model, and the proteins identification in *C. gattii* strain after infection. Disease progression was assessed by the behavioral analysis, quantification of CFU in the organs and expression of type I interferons. After recovery of fungal colonies was evaluated the expression of genes encoding efflux pumps, ERG11 gene and the genes responsible for the synthesis and assembly of polysaccharide capsule. Recovered colonies proteins for mass spectrometric analysis were also extracted. The immunosuppression model was induced by dexamethasone. In the present study, the subdose of fluconazole alter the virulence factors of the fungus, decreases the susceptibility to fluconazole, modifying the host inflammatory response and increases the morbidity of mice infected with *C. gattii*. Treatment with fluconazole even in immunosuppressed host, increases survival of it. And that immunosuppression contributed to a decrease in yeast migration to the central nervous system (CNS) in animals, probably due to lower phagocytic activity and reduced fungicidal activity of macrophages from such animals. In conclusion, we supply new perspectives on treatment with fluconazole in cryptococcosis. Knowledge of the way by which the factors of resistance to fluconazole affect the virulence of *C. gattii* and the host immune response is critical to understand the clinical impact of antifungal resistance in cryptococcosis. Due to the increasing number of cases and deaths by cryptococcosis, studies involving *C. gattii* and address the factors that antifungal resistance should be a research priority.

Key-words: systemic mycosis; virulence factors; susceptibility; treatment; inflammatory response; immunosuppression



## 1. INTRODUÇÃO

A criptococose é uma micose sistêmica causada por um complexo de fungos patogênicos identificados no gênero *Cryptococcus* (OLIVEIRA, 1997). É uma doença adquirida por inalação de propágulos infectantes fúngicos, que inclui duas formas clínicas distintas. A primeira, criptococose oportunística, de ocorrência cosmopolita, associada a condições de imunodepressão celular do hospedeiro e causada por *Cryptococcus neoformans* e a segunda, criptococose primária, uma doença endêmica em áreas tropicais e subtropicais ocorrendo em hospedeiros imunocompetentes e causada por *Cryptococcus gattii*. Ambas as formas clínicas caracterizam-se por meningoencefalite de evolução grave e fatal, acompanhada ou não de lesão pulmonar evidente, fungemia e focos secundários para pele, ossos, rins, supra-renal, entre outros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Fluconazol é uma droga de escolha em terapia contra criptococose, apresentando baixa toxicidade e mostra penetração adequada em vários tecidos, incluindo o sistema nervoso central (FICA, 2004). No entanto, um grande número de casos de desenvolvimento de resistência fúngica foi descrito, comprometendo a terapia (REVANKAR *et al.* 2004; LARSEN *et al.*, 2004; SOARES *et al.*, 2008).

Os testes de susceptibilidade *in vitro* fornecem informações sobre o potencial de um determinado agente antifúngico, mas a previsão do sucesso da resposta clínica a uma terapia exige também a avaliação *in vivo* para o conhecimento dos perfis farmacocinéticos, farmacodinâmicos e da resposta imune do hospedeiro. No entanto, ainda há poucos trabalhos *in vivo* de *C. gattii* frente aos agentes antifúngicos.

Apesar de alguns mecanismos de resistência dos fungos frente aos azóis já estarem elucidados, ainda há dificuldades quanto à compreensão do fenômeno de resistência durante o tratamento da criptococose *in vivo*. Dessa forma, são necessários estudos que avaliem o desenvolvimento da resistência aos antifúngicos *in vivo* na criptococose para a melhor compreensão dos mecanismos de resistência desenvolvidos por este patógeno e da influência da resistência fúngica sobre a resposta imune do hospedeiro.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Criptococose

A criptococose é uma infecção sistêmica causada por *Cryptococcus* (CHANDLER *et al.*, 1997). A levedura provoca infecção humana, podendo se mostrar como uma colonização pulmonar assintomática e até mesmo como uma meningite ou uma doença disseminada (CASADEVALL; PERFECT, 1998). A doença já foi relatada em diversos estados do Brasil como Minas Gerais (SOARES *et al.*, 2008; COUTINHO *et al.*, 2011), Rio de Janeiro (PINTO JUNIOR *et al.*, 2010), São Paulo (ALMEIDA *et al.*, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2014; LOMES *et al.*, 2016), Espírito Santo (BALTAZAR; RIBEIRO, 2008), Mato Grosso (FAVALESSA *et al.*, 2009; ANZAI *et al.*, 2014), Mato Grosso do Sul (LINDENBERG *et al.*, 2008), Amazonas (FREIRE *et al.*, 2012), Piauí (MARTINS *et al.*, 2011), Rio Grande do Sul (LEAL *et al.*, 2008; SPIES *et al.*, 2015), Pernambuco e Bahia (TRILLES *et al.*, 2008; HAGAN *et al.*, 2014).

Duas espécies de *Cryptococcus* são as principais causadoras da criptococose. Uma delas, *C. gattii* que é tipicamente encontrado em regiões de clima tropical e subtropical, usualmente é o causador da doença em hospedeiros imunocompetentes, enquanto que a outra espécie, *C. neoformans*, está associada a fezes de pombos, possui uma distribuição mundial e gera uma infecção oportunista em hospedeiros imunocomprometidos (BOVERS *et al.*, 2008a). Além disso, *C. gattii* difere de *C. neoformans* em caracteres fenotípicos, habitat natural, epidemiologia, manifestações clínicas da doença e resposta ao tratamento antifúngico (SPEED; DUNT, 1995; CASADEVALL; PERFECT, 1998; CHEN *et al.*, 2000; SORRELL, 2001). As espécies de *C. neoformans* compreendem os sorotipos A, D e AD, enquanto que *C. gattii* compreendem os sorotipos B e C (MERSHON *et al.*, 2009). O que determina os sorotipos é basicamente o tipo de antígeno, composto principalmente por glucuronoxilomanana (GXM) (FELDMESSER *et al.*, 2001). Os sorotipos diferem em aspectos ecológicos, epidemiológicos, fisiológicos e genéticos (REZENDE *et al.*, 2008).

Entre os casos de criptococose, aquela causada pelo sorotipo A (*C. neoformans* var *grubii*) é a mais comumente encontrada em amostras clínicas em todo o mundo, sendo o sorotipo isolado em mais de 95% dos casos de criptococose. A criptococose causada pelo sorotipo D (*C. neoformans* var *neoformans*) é geralmente encontrada em alguns países europeus, como Dinamarca, Alemanha, Itália, França, Suíça e Estados Unidos (KWON-CHUNG; BENNETT, 1984). O fungo *C. gattii* que era isolado principalmente em regiões tropicais e zonas subtropicais é também encontrado em regiões de clima temperado (KIDD *et al.*, 2007). No Brasil, estudos clínico-epidemiológicos mostraram a

importância da criptococose por *C. gattii* de sistema nervoso central em adultos jovens de ambos os sexos e crianças nas regiões norte e nordeste, com letalidade de 35 a 45% (MORETTI, *et al.*, 2008).

Na literatura, também estão descritos casos de meningite, afecções pulmonares, abscessos e dermatomicoses causados por outras espécies de *Cryptococcus*, como *Cryptococcus laurentii* e *Cryptococcus albidus* (JOHNSON *et al.*, 1998; NEVES *et al.*, 2015), e de acordo com Khawcharoenporn e colaboradores (2007), estas espécies juntas são responsáveis por 80% dos casos de criptococose causada por *Cryptococcus* não-*neoformans* e não-*gattii*.

A maioria das infecções por *Cryptococcus* spp. é adquirida por esporos do fungo presentes em poeiras contaminadas que atingem o organismo humano pelo trato respiratório. *Cryptococcus* spp. pode causar infecções localizadas em qualquer órgão que envolvem a pele, olhos, miocárdio, ossos, articulações, pulmões, próstata, trato urinário, ou SNC (PERFECT, 1989). Substâncias presentes no cérebro do hospedeiro, como catecolaminas, funcionam como substratos para fenoloxidase, enzima importante na produção de melanina pela levedura, podendo explicar a propensão do patógeno em infectar o SNC (LIU *et al.*, 1999).

A inalação de leveduras dessecadas ou basidiósporos pode produzir uma infecção pulmonar assintomática autolimitada, e as leveduras permanecem latentes, morrem ou podem causar doença (Figura 1). A disseminação pulmonar a outros órgãos pode potencialmente ocorrer como resultado de uma infecção primária ou secundária (PERFECT, 1989).

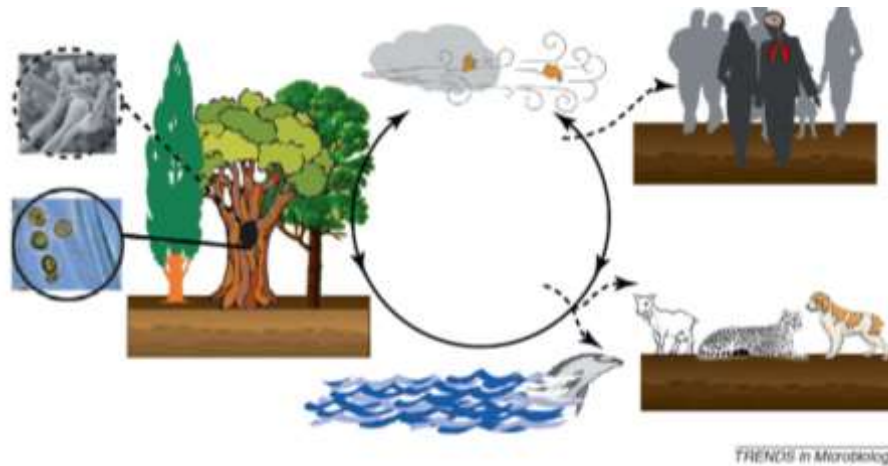


Figura 1: Ciclo natural sugerido de *Cryptococcus gattii* e eventos que levam à criptococose. O ciclo pode se iniciar em plantas, solo, ar e água, sem necessidade de hospedeiros intermediários. Humanos e animais podem entrar em contato com propágulos fúngico e permanecem assintomáticos, mas um pequeno número de humanos e animais infectados desenvolvem infecções graves nos pulmões e cérebro. Fonte Chauverdi; Chauverdi, 2011.

As doenças causadas pelas duas espécies possuem diferenças importantes na epidemiologia, na apresentação clínica e nos resultados terapêuticos. *C. gattii* parece invadir o parênquima cerebral mais comumente do que *C. neoformans* e em pacientes infectados por *C. gattii*, infecções pulmonares e lesões de massa pulmonares são mais comuns (MITCHELL; PERFECT, 1995; SPEED; DUNT, 1995).

Esta condição é também uma das infecções oportunistas definidoras de AIDS, e em países subdesenvolvidos, ainda apresenta importante porcentagem de mortalidade (HORTA *et al.* 2002; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004; PAPPALARDO *et al.*, 2007; LINDENBERG *et al.*, 2008). Embora menos comum, a criptococose em pacientes HIV-negativos também tem uma alta taxa de mortalidade (KIERTIBURANAKUL *et al.*, 2006), particularmente em áreas como o norte do Brasil, onde *C. gattii* é endêmico e é responsável por 62,7% dos casos de criptococose (NISHIKAWA *et al.*, 2003).

Devido à criptococose não ser uma doença de notificação compulsória, é difícil o conhecimento exato sobre a taxa de prevalência no Brasil.

## 2.2 Gênero *Cryptococcus*

O gênero *Cryptococcus* compreende mais de 70 espécies de fungos caracterizados como leveduras capsuladas, das quais *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são comumente

considerados como os principais agentes da criptococose (CASADEVALL; PERFECT, 1998; BARNETT, 2010). *Cryptococcus gattii* (anamorfo / fase assexuada)-*Filobasidiella bacillispora* (teleomorfo / estágio sexual) é inserido taxonomicamente no filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina, família Tremellales e gênero *Filobasidiella* (FELL *et al*, 2000).

O primeiro relato de criptococose ocorreu em 1894, pelos médicos alemães Otto Busse e Abraham Bushcke, quando isolaram uma levedura capsulada na tíbia de um paciente do sexo feminino de 31 anos de idade. Na ocasião esta levedura foi denominada *Saccharomyces hominis*. No ano seguinte, Francesco Sanfelice demonstrou a patogenicidade de uma levedura isolada de suco de pêssago em animais de laboratório na Itália, e denominou-a de *Saccharomyces neoformans* (RIPPON, 1988). Em 1901, Vuillemin sugeriu uma reclassificação para os isolados de Busse e Bushcke e Sanfelice, devido ao fato de que estes não formavam ascósporos, como também não fermentavam açúcares, inserindo-os no gênero *Cryptococcus* (CASADEVALL; PERFECT, 1998). Em 1935, após estudos morfológicos, sorológicos e taxonômicos de mais de 40 leveduras, incluindo os isolados de Busse e Bushcke e Sanfelice, Benham concluiu que todos pertenciam à mesma espécie e propôs a mesma nomenclatura utilizada por Vuillemin, estabelecendo *C. neoformans* (BENHAM, 1935).

Anos mais tarde, Evans (1950) encontrou diferenças antigênicas do mucopolissacarídeo capsular, permitindo agrupar as cepas de *C. neoformans* em três sorotipos distintos (A, B e C). Em 1968, Wilson e colaboradores identificaram o sorotipo D.

A partir de 1970, diferenças morfológicas, bioquímicas, sorológicas e epidêmicas foram encontradas entre as espécies de *Cryptococcus*, elevando-as a variedades diferentes. Neste mesmo ano, o médico Franco Gatti isolou a levedura de uma amostra de líquido cefalorraquidiano (LCR) de um paciente com meningite (GATTI; EECKLES, 1970). Vanbreuseghem e Takashio (1970) propuseram a denominação *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, a qual foi aceita até o ano de 2002.

Estudos moleculares, com a finalidade de comparar a sequência de vários genes (URA5, CNLAC1, CAP64, IGS, ITS de rRNA) de *C. neoformans* var. *neoformans* e *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, demonstraram uma evidente distinção entre os isolados (KWON-CHUNG *et al.*, 2002). Estas análises, juntamente com a análise genética da progênie e de dados de tipagem molecular, fizeram com que Kwon-Chung e colaboradores (2002) propusessem uma nova espécie: *Cryptococcus gattii*.

### 2.2.1 *Cryptococcus gattii*

O primeiro isolamento de *C. gattii* foi a partir de um paciente com leucemia em 1970, e descrito como uma variedade de *C. neoformans* (VANBREUSEGHEM; TAKASHIO, 1970). Historicamente, *C. gattii* era relatado como endêmico de regiões tropicais e subtropicais como Austrália, Brasil e sul da Califórnia (KWON-CHUNG; BENNETT, 1984; SORREL, 2001), mas a partir da década de 1990, sua ocorrência foi reconhecida também em zonas temperadas como o Canadá e Estados Unidos (MARR, 2012), e vem sendo considerado um patógeno emergente em várias partes do mundo como Europa e Ásia (HARRIS *et al*, 2014).

Os isolados de *C. gattii*, como também os de *C. neoformans*, reproduzem-se assexuadamente por brotamento, estando a maioria dos isolados clínicos e ambientais presentes na forma anamórfica haplóide. Contudo, esta levedura pode se reproduzir sexuadamente, correspondendo à forma teleomórfica, sendo este estágio denominado de *Filobasidiella bacillispora* e *F. neoformans*, correspondente aos anamorfos *C. gattii* e *C. neoformans*, respectivamente (BIRCHARD; SHERDING, 1998). Ambas as espécies de *Cryptococcus* são heterotáticas na forma teleomórfica com dois genótipos MAT $\alpha$  e MAT $\alpha$  (HEITMAN *et al*, 1999; BARONI *et al.*, 2006).

O habitat natural de *C. gattii* foi primeiramente identificado por Ellis e Pfeiffer em 1990, associando a então variedade *C. neoformans* var. *gattii* ao *Eucalyptus camaldulensis*, passando a relacionar a distribuição deste eucalipto com a criptococose causada por esta espécie (Ellis; Pfeiffer, 1990).

Até recentemente, *C. gattii* não era bem estudado, pois a infecção por este micro-organismo representava apenas 1% dos casos de criptococose em todo o mundo (HANSONG; ROBIN, 2009). Mesmo em áreas onde *C. gattii* é endêmico, como a Austrália, a taxa de infecção era de 0,94 casos por milhão de habitantes ao ano (CHEN *et al.*, 2000, SORRELL, 2001). No entanto, a epidemia de criptococose causada por *C. gattii* tem estimulado mais estudos sobre esta espécie. Essa epidemia foi inicialmente observada em 1999, na Ilha de Vancouver, Canadá. A incidência média anual de criptococose na Colúmbia Britânica, Ilha de Vancouver, era de 6,5 casos por milhão em 2002 e foi para 27,9 casos por milhão em 2006 (KIDD *et al.*, 2004).

O aumento na incidência da doença causada por *C. gattii* é provavelmente uma consequência de alterações na ecologia e biologia do fungo, incluindo a sua crescente capacidade de causar doença fatal. A colonização de ambientes em regiões de clima temperado indica que *C. gattii* é capaz de se adaptar às novas condições ambientais (DIXIT *et al*. 2009).

*C. gattii* foi consistentemente isolado de madeira em deterioração de várias espécies de árvores, especialmente de árvores de eucalipto (*Eucalyptus* ser. *Exsertae* Blakely) (ELLIS; PFEIFFER, 1990; LAZÉRA *et al.*, 2000; KROCKENBERGER *et al.*, 2002;). Springer e Chaturvedi (2010) relacionaram este fungo a mais de 50 espécies de árvores, entre elas *Acacia visco*, *Pinus* spp. e *Eucalyptus* spp., em áreas tropicais, subtropicais e em regiões de clima temperado. Estas espécies vegetais podem ser consideradas nichos ecológicos do *C. gattii*.

A espécie *C. gattii* corresponde a quatro tipos moleculares VGI, VGII, VGIII, e VGIV, apresentando distribuição mundial distinta para cada grupo, não sendo correlacionadas aos sorotipos (Figura 2). Por este motivo, Bovers e colaboradores (2008b) propuseram tratar estes quatro tipos moleculares como um diferente taxa, em nível de variedade, assim como as variedades *neoformans* e *grubii*. Esses tipos moleculares podem ser encontrados a partir de técnicas de PCR *fingerprint* com a utilização de iniciadores mini (M13) e microssatélite (GACA<sub>4</sub>) específicos (ELLIS *et al.*, 2000), por análise RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) utilizando os genes orotidina monofosfato pirofosforilase (URA5) e fosfolipase (PLB1) (MEYER *et al.*, 2003). E ainda por multi-locus sequence typing (MLST) que utiliza os genes *CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, e *URA5* (MEYER *et al.*, 2009).

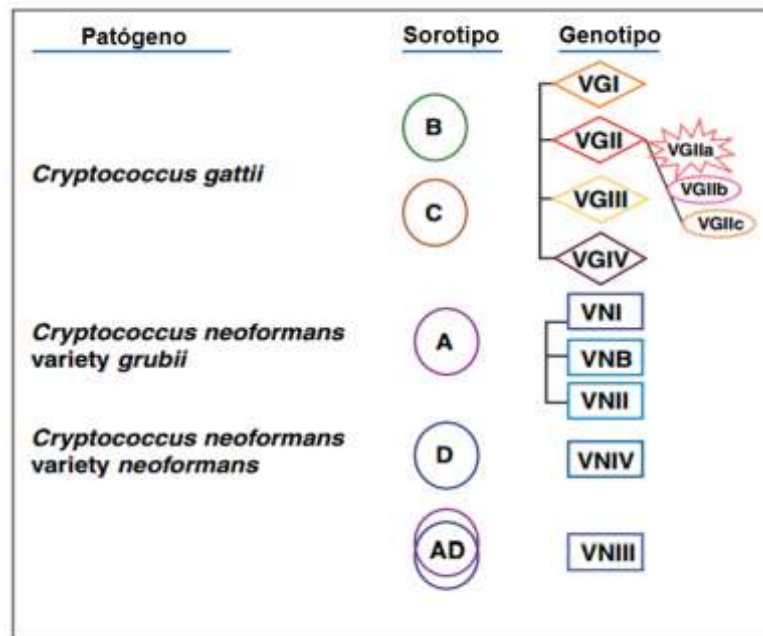


Figura 2: Esquema da filogenia do complexo *C. neoformans*-*C. gattii*. Para *C. neoformans*, duas linhagens monofiléticas, correspondentes às variedades *grubii* e *neoformans*, estão claramente presentes juntamente com a população híbrida. Dentro de *C. neoformans*, os sorotipos correspondem aos genótipos. Para *C. gattii*, quatro linhagens monofiléticas, mas neste grupo os sorotipos e genótipos não necessariamente correlacionam-se uns aos outros. Fonte: Chaturvedi; Chaturvedi, 2011.

Entre os diferentes tipos moleculares de *C. gattii*, existem diferenças ecológicas e geográficas. Uma pesquisa conduzida em 16 países revelou que os tipos moleculares mais comumente encontrados na forma clínica e ambiental foram VG I e VG II (ELLIS *et al.*, 2000). O genótipo VG III foi relatado na América do Sul, Estados Unidos, México, Europa, Índia, Austrália e Nova Zelândia, relatos do genótipo VG IV também foi reportado no México, Colômbia, Europa, África do Sul e Índia (MEYER *et al.*, 2003; TINTELNOT *et al.*, 2004), e mais recentemente, o genótipo VG II que tem sido reportado na Coreia, Austrália (HARRIS *et al.*, 2014) e Brasil (HAGEN *et al.*, 2013). Assim sendo, *C. gattii* tem sido reportado em diversos países do mundo (Figura 3)



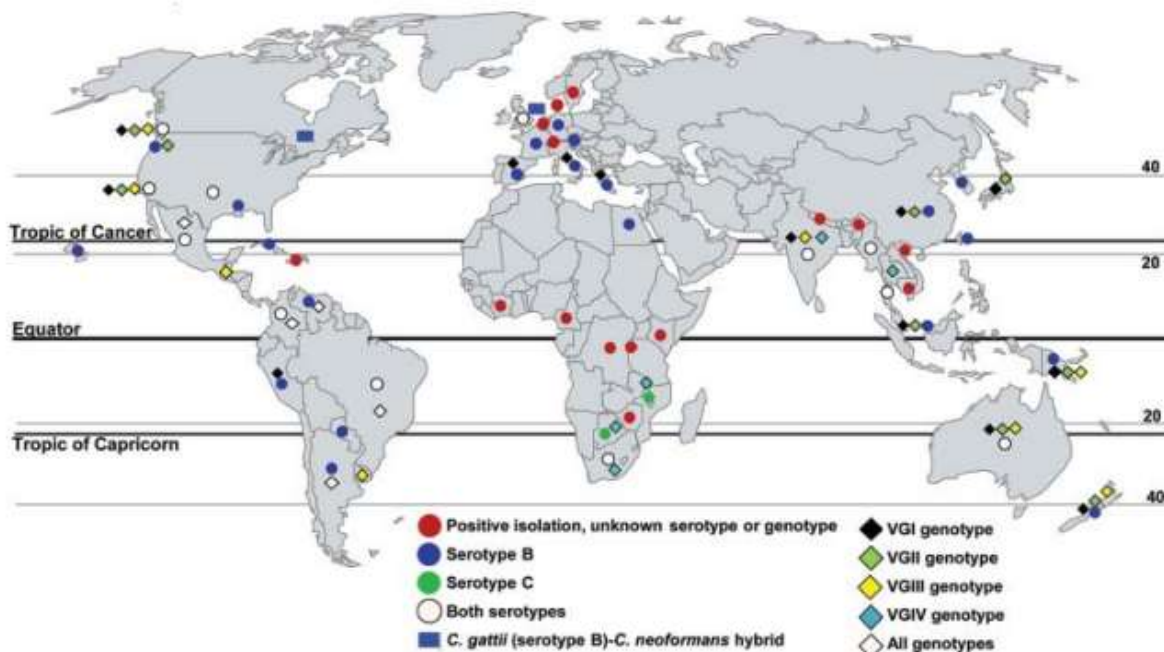


Figura 3: Relatos mundiais de *Cryptococcus gattii* de isolados clínicos humano e veterinário, e de fontes ambientais. Os círculos indicam informações de sorotipo, diamantes indicam informações de genótipo e retângulos indicam os híbridos de *C. gattii* e *C. neoformans*.

Fonte: Springer; Chaturvedi, 2010.

### 2.3 Fatores de virulência de *Cryptococcus*

Fatores de virulência são estruturas, produtos ou estratégias que permitem ao micro-organismo transpor o sistema de defesa do hospedeiro e causar uma doença. *C. gattii* apresenta muitos atributos que aumentam a sua capacidade de invadir e sobreviver em um organismo hospedeiro (PONTÓN; QUINDÓS, 2006).

Os principais fatores de virulência identificados em *Cryptococcus* spp. incluem cápsula polissacarídica, melanina, manitol, proteinase extracelular, superóxido dismutase, fosfolipases, urease, e fator de transcrição STE12 $\alpha$  (um homólogo de *Saccharomyces cerevisiae* STE12) que está presente apenas no matting type  $\alpha$  (ELLERBROEK *et al.*, 2004; DIXIT *et al.*, 2009). Ainda há outras propriedades de *C. gattii* que contribuem para a sua infectividade, tais como a capacidade de crescer à temperatura fisiológica (SORREL, 2001), a tolerância a baixo pH e à níveis elevados de NaCl (KIDD *et al.*, 2007), e a capacidade para comutar fenótipo capsular (JAIN *et al.*, 2006). Na tabela 1, encontram-se alguns fatores de virulência descritos e sua respectiva função associada:

Tabela 1- Fatores de virulência de *Cryptococcus gattii* e suas funções adaptado de DIXIT *et al*, 2009

<b>Fator de virulência</b>	<b>Função exercida</b>
Cápsula e polissacarídeos associados	-Evasão da fagocitose (Kozel, Mastroianni 1976); -Redução da apresentação de antígeno (Collins, Bancroft 1991); -Redução da produção de citocinas (Vecchiarelli <i>et al</i> , 1995); -Indução de células T supressoras que inibem a imunidade mediada por células (Murphy, Moorhead, 1982); -Inibição da resposta das células T por GXM (Yauch <i>et al</i> , 2006); -Inibição da migração leucocitária no sitio inflamatório pela GXM (Yauch <i>et al</i> , 2006; Dong <i>et al</i> , 1999).
Melanina	-Proteção contra radiação UV (Wang, Casadevall, 1994); -Proteção contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Wang <i>et al</i> , 1995; Jacobson, Emery, 1991); -Pode contribuir ao tropismo pelo SNC (Bicanic, Harrison, 2004); -Contribui para a carga celular negativa (Nosanchuk, Casadevall, 1997).
Manitol	-Possível causa do aumento na pressão intracraniana (Megson <i>et al</i> , 1996); -Proteção contra espécies reativas de oxigênio (Chaturvedi <i>et al</i> , 1996).
Proteases extracelulares	-Atividade proteolítica (Chen <i>et al</i> , 1996); -Pode contribuir para a degradação de proteínas envolvidas na integridade tecidual e imunidade do hospedeiro (Chen <i>et al</i> , 1996; Ruma-Haynes <i>et al</i> , 2000).
Produtos da via da Laccase	-Síntese de melanina (Shaw, Kapica, 1972).
Superóxido dismutase	-Proteção contra estresse oxidativo (Narasipura <i>et al</i> , 2005).
Fosfolipases	-Invasão tecidual pela degradação de lipídeos de membrana e surfactantes pulmonares (Chen <i>et al</i> , 2000).
Crescimento a temperatura fisiológica (37°C)	-Sobrevivência e persistência no hospedeiro (Sorrel, 2001).

A cápsula polissacarídica é composta a partir de carboidratos simples que são modificados e montados em estruturas mais complexas. Glucuroxilomanana (GXM), galactoxilomanana (GalXM) e manoproteínas (MPs), componentes da cápsula de *Cryptococcus spp.*, são responsáveis, em parte, pela virulência desta levedura, pois alteram os mecanismos de fagocitose dos macrófagos (O'MEARA; ALSPAUGH, 2012). Recentemente foi demonstrado que isolados de *C. gattii* altamente virulentos processam uma alteração estrutural em GXM permitindo este patógeno evadir a resposta imune e consequentemente sua eliminação (URAI *et al*, 2016).

A cápsula pode se alterar na composição e tamanho por meio de processo chamado de dimorfismo fenotípico e induz a supressão da resposta imune do hospedeiro por vários mecanismos,

incluindo a regulação da expressão de citocinas e de quimiocinas nas células dendríticas (JAIN *et al.*, 2006; LUPPO *et al.*, 2008).

A estrutura da capsula polissacarídica de *Cryptococcus* é complexa, e sua biossíntese requer muitos produtos de genes (BOSE *et al.*, 2003; O'MEARA; ALSPAUGH, 2012). Os genes CAP como CAP10, CAP64, CAP59 e CAP60 são individualmente essenciais para a biossíntese de GXM e mostraram-se essenciais para a virulência em modelo animal de criptococose, enfatizando a importância da cápsula como fator de virulência (JANBON, 2004).

Os monômeros de base de GXM e GalXM são combinados e modificados com porções específicas da cadeia lateral que são importantes para a montagem, a ramificação, e a estrutura geral das fibras. Uma modificação dos monômeros GXM e GalXM é a xilosilação. Este processo é mediado pela enzima Cxt1 $\beta$  -1,2-Xilosiltransferase (CASTLE *et al.*, 2008; WOHLISCHLAGER *et al.*, 2013). Esta enzima transfere xilose em  $\alpha$  -1,3-dimanosídio para criar Xyl- $\beta$  -1,2-Man- $\alpha$  -1,3-Man. Em um isolado mutante Cxt1 $\Delta$ , a célula tem redução de xilose no monômero de GXM e uma completa falta de xilose em monômeros de GalXM. Este isolado teve então sua virulência atenuada (KLUTTS *et al.*, 2007; KLUTTS, DOERING, 2008). As proteínas CAPs são homólogas a Cxt1, e estão envolvidas na adição de xilose a cápsula, sendo provável que estas proteínas estejam reguladas especificamente para alterar a estrutura global da cápsula (O'MEARA, ALSPAUGH, 2012).

A síntese de GXM também requer GDP-manose, UDP-xilose e UDP-ácido glucurônico como precursores, e GalXM requer adicionalmente UDP-galactose. Os carboidratos UDP-ácido glucurônico e UDP-xilose podem ser obtidas a partir de UDP-glucose, pelas ações sequenciais de duas enzimas: UDP-glucose desidrogenase, que conduz à formação de UDP- ácido glucurônico, enquanto que o UDP-glucuronato descarboxilase converte UDP- ácido glucurônico para UDP-xilose. Essas atividades foram detectadas em *C. neoformans* por Jacobson e Payne (1982), e um trabalho posterior identificou os genes que codificam essas duas enzimas (BAR-PELED *et al.*, 2001). Um desses genes (UXS1), que codifica a UDP-glucuronato descarboxilase, foi encontrado através da sua homologia com um gene bacteriano e foi levantada a hipótese de ter uma função semelhante (BAR-PELED *et al.*, 2001). A via de síntese de UDP-xilose é de particular interesse em *Cryptococcus spp.* devido a abundantes e específicas modificações de GXM e GalXM pelo componente xilose (Figura 4).

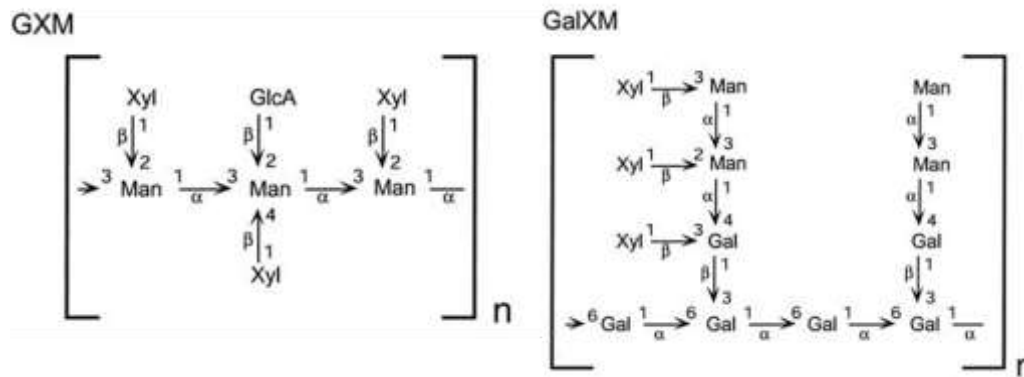


Figura 4: Estruturas dos componentes da cápsula polissacarídica de *Cryptococcus*, Glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM) são mostrados. Abreviaturas: Xyl, xilose; Man, mananas; Gal, galactose; e GlcA, ácido glucurônico. Fonte: Bar-Peled *et al.*, 2001.

O genótipo e as condições de crescimento determinam o tamanho da cápsula, sendo que normalmente apresentam pequenas cápsulas quando no ambiente e cápsulas espessas durante a infecção (MITCHELL; PERFECT, 1995). A virulência da cápsula deve-se aos polissacarídeos capsulares que inibem a fagocitose, consomem complemento, adsorvem e neutralizam opsoninas e outros anticorpos protetores (LAZÉRA *et al.*, 2004). Os polissacarídeos capsulares podem ainda inibir a migração leucocitária; induzir espalhamento de L-selectina; promover edema cerebral e desregulação na produção de citocinas (LARSEN *et al.*, 2005). Por todas estas razões, o polissacarídeo capsular de *Cryptococcus* spp. é um importante fator de virulência que interfere com os mecanismos de defesa do hospedeiro (DIXIT *et al.*, 2009).

A melanina também parece interferir na virulência do fungo. Produtor de uma enzima fenoloxidase, também denominada lacase, *Cryptococcus* spp. é capaz de oxidar substâncias fenólicas e produzir melanina, que funciona como um antioxidante. A melanina se deposita na parede celular e confere às colônias a cor escura (LACAZ *et al.*, 2002) e contribui para a proteção do fungo contra as radiações ionizantes (KWON-CHUNG; RHODES, 1986). A capacidade de produzir melanina também é um dos fatores responsáveis pela dificuldade de obter sucesso na terapia antifúngica (MITCHELL; PERFECT, 1995).

A capacidade de crescer em condições fisiológicas também é um fator de virulência do fungo (CASADEVALL; PERFECT, 1998). *C. gattii* mantém seu crescimento a uma temperatura limite de 35 °C, e inicia a perda de viabilidade a 37 °C. Enquanto que *C. neoformans* mantém sua curva de crescimento a 38-39 °C e começa a perder a viabilidade somente após 24 horas a 40 °C. (LAZÉRA *et al.*, 2004).

A capacidade para comutar o fenótipo capsular é outro importante fator de virulência de *Cryptococcus* spp.. A mudança fenotípica, capacidade associada a mudanças na cápsula polissacarídica, tem papel crucial na patogênese e facilita a disseminação do fungo para o SNC. Foi observado que *C. gattii* é capaz de mudar o aspecto da colônia de lisa para rugosa, sendo essa mudança reversível em alguns sorotipos. O microambiente do hospedeiro pode determinar o fenótipo dominante da população patogênica, de forma que esta modificação fenotípica permite ao patógeno se adaptar a diferentes microambientes, podendo levar a alterações na virulência (JAIN *et al.*, 2006).

Também são descritos outros aspectos que contribuem para a patogenicidade do fungo, como a produção de manitol, relacionada com o aumento da pressão intracraniana e na proteção fúngica contra o estresse, choque térmico (MEGSON *et al.*, 1996), de urease, que pode auxiliar na disseminação para o SNC (SINGH *et al.*, 2013), a capacidade de secreção de proteinases e fosfolipases extracelulares, tolerância a baixos pH e elevados níveis salinos (DIXIT *et al.*, 2009), síntese de ácido hialurônico (HA), um transcrito do gene *CPS1* no *Cryptococcus* spp., o qual é um componente necessário para a invasão das células endoteliais microvasculares do cérebro humano (HBMEC) que constituem a barreira hemato-cefálica (Figura 5). Aumentos nos níveis de HA em *C. neoformans* foi proporcional à capacidade de ligação do fungo a HBMEC (JONG *et al.*, 2007). O antioxidante superóxido dismutase (SOD) em *C. gattii*, protege a integridade funcional de diversos fatores de virulência. Novos estudos mostraram que SOD é necessária para infecção em modelo animal e para proteção contra fagócitos humanos (COX *et al.*, 2003).

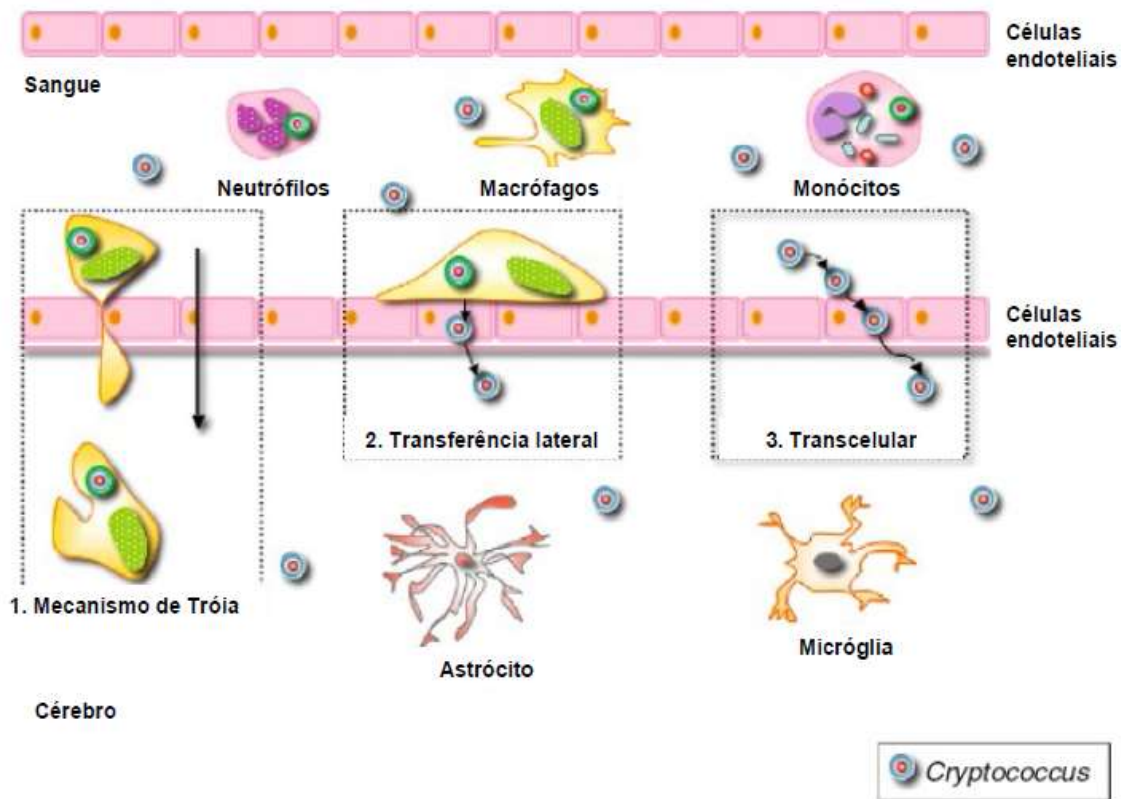


Figura 5: Invasão ao sistema nervoso central. Possíveis rotas para *Cryptococcus* atravessar a barreira hemato-encefálica: (1) mecanismo de cavalo de Tróia; (2) transferência lateral; e (3) travessia intracelular. Fonte: Ma; May, 2009.

Além disso, os estresses oxidativo e nitrosativo desempenham um importante papel na atividade antifúngica contra *C. gattii* de terapêuticos como itraconazol e anfotericina B, ressaltando a importância da defesa antioxidante desse patógeno (FERREIRA *et al*, 2013).

## 2.4 Terapia antifúngica

Existem alguns antifúngicos bem estabelecidos para o tratamento das infecções causadas por *Cryptococcus* spp. A anfotericina B (AMB), um polieno introduzido em meados dos anos 1950, foi a primeira terapia eficaz desenvolvida (BRAJTBURG *et al.*, 1990). O fluconazol (FLC), um triazol que inibe a síntese de ergosterol do fungo é também utilizado (JARVIS; HARRISON, 2007), pois tem excelente absorção e penetração através das meninges.

Segundo o mecanismo de ação, os diversos agentes antifúngicos disponíveis são distribuídos em grupos. Dentre o grupo dos poliênicos, os principais representantes são a AMB, descoberta por Gold (1956) e isolada de *Streptomyces nodosus* (TREJO; BENNETT, 1963), e a nistatina isolada a

partir de *Streptomyces noursei* (HAZEN; BROWN, 1950). Os antifúngicos poliênicos possuem ação primária que consiste na alteração da permeabilidade celular da membrana citoplasmática fúngica (KWAN *et al.*, 1972), ligando-se ao ergosterol e produzindo poros ou canais (SANGLARD, 2002) que aumentam a permeabilidade da membrana, permitindo uma grande perda de eletrólitos, especialmente potássio, determinando assim a lise e morte celular (SHEPPARD; LAMPIRIS, 2005).

A AMB tem efeito fungicida e atua como um importante imunomodulador que pode aumentar a função de macrófagos (WHITE; ARMSTRONG, 1994; CLEMONS; STEVENS, 1998), porém, a droga é considerada tóxica, apresentando diversos efeitos colaterais (BENNETT, 2003). Por ser pouco absorvida tanto na mucosa oral quanto pelo trato gastrointestinal, AMB deve ser administrada por via endovenosa (SAAG; DISMUKES, 1988).

Poucos relatos foram descritos na literatura sobre a resistência à AMB (VANDEN *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2008). Quando ocorre, esta resistência é explicada pelo decréscimo da quantidade de ergosterol presente na membrana celular fúngica ou pela modificação da molécula-alvo do esterol de modo a reduzir sua afinidade pela droga (SHEPPARD; LAMPIRIS, 2005; SANTOS *et al.*, 2012).

No grupo dos azólicos encontram-se os derivados imidazólicos e triazólicos. Esses fármacos possuem efeito fungistático nas concentrações terapêuticas (SANGLARD, 2002). Dentre os derivados imidazólicos, o primeiro antifúngico introduzido foi o miconazol (DERESINSKI *et al.*, 1977). Nos anos 1990 e 1992 foram lançados os triazólicos fluconazol e itraconazol, respectivamente. Estes antifúngicos são importantes opções terapêuticas contra uma série de infecções, pois apresentam vantagem como facilidade de administração oral e um menor potencial de toxicidade que os demais antifúngicos (TERREL, 1999). Os derivados triazólicos são hidrossolúveis e apresentam extensa distribuição pelos tecidos e fluídos orgânicos como urina, escarro, saliva e líquido cefalorraquidiano (LCR). Apresentam ainda absorção via oral satisfatória e menor afinidade por proteínas plasmáticas, possibilitando boa penetração no LCR (PERFECT; DURAK, 1986; TERREL, 1999). Os azólicos inibem a atividade da lanosterol 14 $\alpha$  desmetilase, uma enzima responsável pela conversão de lanosterol em ergosterol, produzindo uma alteração na permeabilidade da membrana fúngica (DUNKEL *et al.*, 2008). Sem a incorporação do ergosterol, a fluidez e a estabilidade da membrana ficam comprometidas, assim como o crescimento e a divisão celular (SHEPPARD; LAMPIRIS, 2005). O itraconazol apresenta boa distribuição em tecidos queratinizados como a pele, entretanto, não alcança alguns fluídos orgânicos como LCR em níveis terapêuticos (SIDRIM; ROCHA, 2004).

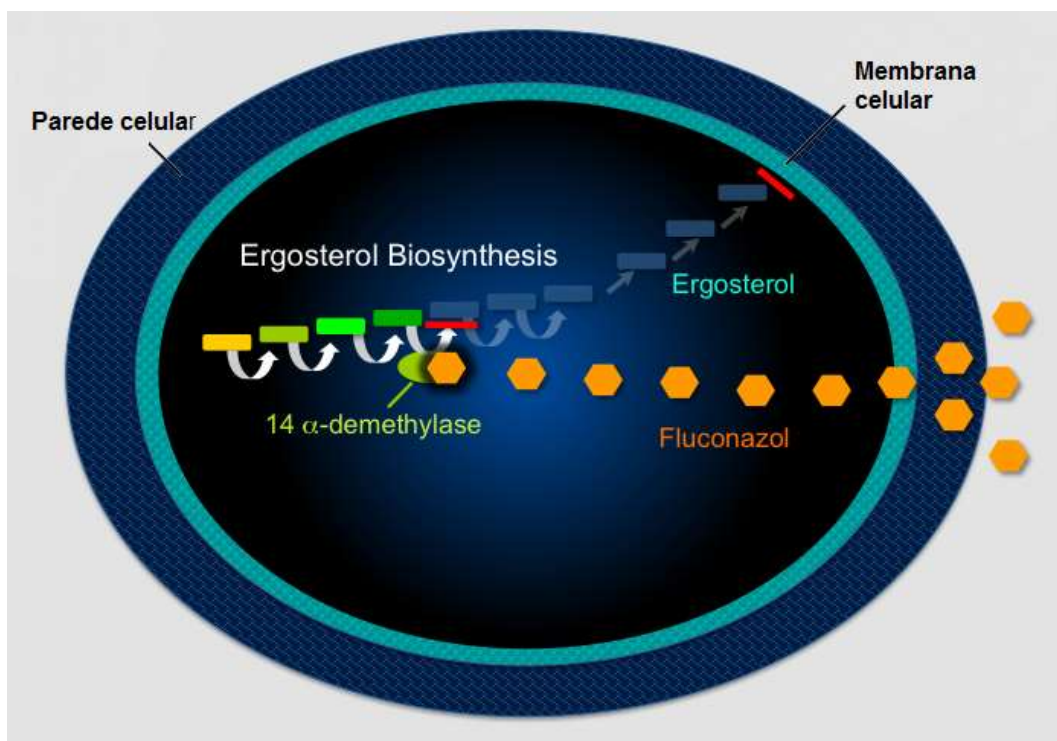


Figura 6: Mecanismo de Ação de Fluconazol. Fluconazol exerce o seu papel por meio da inibição seletiva da enzima 14- $\alpha$  demetilase. Fonte: White *et al.*, 1998.

O FLC pode ser administrado por via oral ou intravenosa e sua biodisponibilidade é de aproximadamente 90% após ingestão oral (KOKS *et al.*, 1996). No plasma, as concentrações máximas são obtidas entre 30 minutos à uma hora e 30 minutos após a administração oral, com meia vida de 30 horas (SIDRIM; ROCHA, 2004). É uma droga pouco tóxica, entre todos os azólicos é o que possui menos efeito sobre as enzimas microssomais hepáticas (SHEPPARD; LAMPIRIS, 2005), sendo excretado principalmente por via renal (KOKS *et al.*, 1996). Contudo, diversos casos de isolados resistentes ao fluconazol já foram relatados (MITCHELL; PERFECT, 1995; SOARES *et al.*, 2008; GOVENDER *et al.*, 2011; SIONOV *et al.*, 2012).

A escolha do antifúngico depende do sítio de infecção e da imunidade do paciente. O tratamento difere para a espécie *C. gattii* que requer maior dose de AMB que *C. neoformans*, tratamento mais prolongado (DE BEDOUT *et al.*, 1999). Da mesma forma, as sequelas são mais frequentes e a mortalidade é maior. Uma alternativa à AMB é o FLC. O tratamento de pacientes com AIDS e meningite por *C. gattii* com fluconazol não apresenta uma resposta clínica adequada e os teste de susceptibilidade *in vitro* mostram, geralmente, concentrações inibitórias mínimas (CIM) elevadas para o fluconazol, sugerindo resistência ou susceptibilidade reduzida (PEETERMANS *et al.*, 1993).



Gómez-Lopez e colaboradores (2008) estudaram cepas clínicas de *Cryptococcus* spp. de diversos países, incluindo o Brasil, e compararam a atividade das drogas antifúngicas AMB e 5-flucitosina (5FC). Os autores concluíram que *C. gattii* é mais sensível à AMB e 5FC do que *C. neoformans*. Infelizmente, o tratamento com 5FC não está disponível no Brasil. A maior susceptibilidade de *C. gattii* à AMB, quando comparada à de *C. neoformans*, já havia sido anteriormente observada (TAY *et al.*, 2006). De modo contrário, os isolados de *C. neoformans* foram mais susceptíveis aos azóis FLC, itraconazol, voriconazol, ravuconazol e posaconazol que os isolados de *C. gattii* (GÓMEZ-LOPEZ *et al.* 2008).

Considerando estas dificuldades no tratamento da criptococose, principalmente aquela causada por *C. gattii*, a combinação antifúngica representa uma alternativa importante para a terapia convencional. A combinação de drogas normalmente requer doses mais baixas dos agentes antifúngicos, que pode levar a uma diminuição de toxicidade, resultando numa maior tolerância pelo paciente. Isso aumenta a eficácia e a velocidade de ação dos agentes (SANTOS *et al.*, 2012).

Em 1998, estudos clínicos já mostraram a eficácia das combinações de drogas antifúngicas contra a meningite criptocócica, obtendo uma taxa de sucesso de 55 a 65% em indivíduos com ou sem AIDS, enquanto que a taxa de sucesso ao utilizar um único agente antifúngico foi de 35 a 40% (DIAMOND *et al.*, 1998). Combinações de drogas também foram testadas recentemente. A interação entre AMB e FLC *in vitro* sobre *C. gattii* foi alvo do estudo de Santos e colaboradores (2012). Estes autores avaliaram a CIM, concentração inibitória fracionária, curva de tempo de morte e efeito pós-antifúngico. Quantificação do ergosterol também foi realizada para avaliar a influência do teor de ergosterol sobre a interação entre esses antifúngicos, os quais variam de sinérgica para antagonistas e é dependente da concentração e isolado testado (SANTOS *et al.*, 2012).

Apesar dos diversos avanços terapêuticos, a toxicidade, a baixa estabilidade, a resistência, a falta de biodisponibilidade oral e o alto custo das drogas antifúngicas limitam o tratamento da criptococose (LARSEN *et al.*, 2004).

## 2.5 Resistência aos antifúngicos

Devido ao crescimento da população imunocomprometida e do uso cada vez mais frequente de profilaxia e tratamento empírico com antifúngicos, há grande preocupação sobre a possibilidade do aumento de fungos resistentes aos fármacos. E, além dos fatores intrínsecos do patógeno, o uso abusivo dos derivados azólicos levou ao aparecimento de isolados multirresistentes, como exemplo dessa resistência, foi avaliada a atividade *in vitro* do itraconazol em isolados de *C. neoformans* e a droga foi ativa em apenas 80% dos isolados (PEREA; PATTERSON, 2002).

Resistência clínica é definida como persistência ou progressão de uma infecção, mesmo com a administração de uma terapia antimicrobiana apropriada. Por outro lado, resistência microbiana é um fenômeno verificado *in vitro*, no qual o agente etiológico consegue se desenvolver na presença de concentrações terapêuticas da referida droga (PAPPALARDO, 2009). A resistência tem forçado a síntese de novos antimicrobianos, cuja eficácia depende também de fatores do hospedeiro (PEREA; PATTERSON, 2002).

Assim como outros micro-organismos, os fungos podem ser naturalmente resistentes a determinadas drogas antifúngicas, consistindo em resistência primária, ou podem desenvolver resistência à droga durante exposição ao tratamento, consistindo na resistência secundária (PEREA; PATTERSON, 2002; SIONOV *et al*, 2013). Entretanto, diferentemente das bactérias, com os fungos a resistência não ocorre rapidamente devido à sua natureza eucariótica e por necessitar de um tempo maior de replicação (GROLL; KOLVE, 2004).

O significado da resistência não está somente vinculado à susceptibilidade do organismo à droga, mas irá depender de outros fatores como o perfil imunológico do hospedeiro e sua tolerância à droga, o sítio de infecção, o grau de penetração e distribuição da droga, a presença de um foco persistente de infecção, como catéteres (PERFECT; COX, 1999), e administração de subdoses da droga.

Não são raros na literatura os relatos sobre susceptibilidade das cepas de *Cryptococcus* spp. aos antifúngicos. Como exemplos, Pappalardo e colaboradores (2009) que evidenciaram a resistência de amostras clínicas de *C. neoformans* a AMB, Mendes e colaboradores (2010) demonstraram a possibilidade de desenvolvimento de resistência durante a terapia antifúngica com FLC contra *C. gattii*, e ainda Trilles e colaboradores (2011) que apresentaram uma forte correlação entre a susceptibilidade antifúngica e o tipo molecular dos membros do complexo *Cryptococcus neoformans* / *C. gattii*. Relatos mais recentes demonstram que a heteroresistência ao itraconazol altera a morfologia

de *C. gattii* (FERREIRA *et al*, 2015), e que ao longo dos anos a resistência de *C. neoformans* tem aumentado tanto para fluconazol quanto para AMB na África (SMITH *et al*, 2015).

Estratégias para a prevenção da resistência às drogas antifúngicas devem ser tomadas e incluem particularidades como a modulação imune do hospedeiro, a otimização da dose, os tratamentos de combinação e desenvolvimento de novos agentes antifúngicos. (PERFECT; COX 1999).

### 2.5.1 Mecanismos de resistência à terapia antifúngica

O desenvolvimento de resistência aos antifúngicos é um importante fator para a falha terapêutica no tratamento das infecções fúngicas. Uma causa comum dessa resistência é a infecção com uma cepa fúngica para a qual a CIM da droga é superior à média (WHITE *et al.*, 1998). Com o aumento na incidência das infecções causadas por cepas resistentes, cresce também a necessidade do desenvolvimento de terapias mais efetivas. Para tanto, é fundamental o conhecimento sobre os mecanismos moleculares de resistência fúngica (ROSSI, 2011).

As mutações ocorrem naturalmente nas células dos micro-organismos e a droga age como agente seletivo daqueles mais resistentes de uma população microbiana. Assim, os isolados que apresentam mutações estáveis ligadas à resistência irão predominar e persistir, mesmo na ausência da pressão seletiva da droga. Vários fatores podem levar à resistência, como substituição de uma cepa susceptível por uma resistente, alterações genéticas que tornam um isolado resistente, expressão genética que torna uma cepa temporariamente resistente e o tamanho e variabilidade da população (WHITE *et al.*, 1998).

As maiores taxas de falha terapêutica associadas à resistência clínica são verificadas frente às drogas azólicas, mas alguns estudos revelaram o fato também com anfotericina B. A resistência primária ou secundária a AMB em isolados de *Cryptococcus* spp. é relativamente rara e ocorre devido a produção de alterações qualitativas e quantitativas nos esteróis da membrana celular fúngica (PEREA *et al.*, 2002). A resistência também pode ocorrer pela substituição do ergosterol por outros tipos de esteróis (PONTÓN; QUINDÓS, 2006).

Resistência de leveduras a derivados azólicos, especialmente ao fluconazol, pode ocorrer por uma variedade de mecanismos que incluem superexpressão do gene ERG11 e de bombas de efluxo, interferência com a atividade sobre a lanosterol 14 $\alpha$  desmetilase, alterações em outras enzimas da síntese do ergosterol e diminuição da permeabilidade da membrana plasmática ao fármaco (PERFECT; COX, 1999, PONTÓN; QUINDÓS, 2006; GAST *et al*, 2013). A resistência em *C. gattii* tem ocorrido principalmente em pacientes com AIDS que desenvolvem criptococose. Durante a terapia de

manutenção com FLC, o fungo gera um mecanismo capaz de reprimir a ação do antifúngico, levando à recidiva da doença (PEREA; PATTERSON, 2002).

Os mecanismos mais comuns de resistência a azólicos em patógenos fúngicos têm sido relacionados às alterações no gene ERG11/CYP51, envolvendo mutações pontuais ou superexpressão desse gene (Figura 7). A enzima alvo predominante das drogas azólicas é a lanosterol 14 $\alpha$  desmetilase, e o gene que codifica esta proteína é designado ERG11 em todas as espécies de fungos, anteriormente referido CYP51 ou ainda ERG16 em *Candida albicans* (WHITE *et al.*, 1998). Mutações pontuais em ERG11 podem gerar resistência aos azólicos. White (1997) identificou uma mutação no gene ERG11 a partir de um isolado clínico azólico-resistente comparado a um isolado sensível. A substituição de uma arginina por uma lisina no aminoácido 467 do gene ERG11 resultou na mutação que provocou alterações estruturais e funcionais associadas ao cofator heme. A superexpressão do gene ERG11 tem sido frequentemente associada à resistência aos azólicos em *Candida spp.*. Esse mecanismo de resistência envolve um efeito de dosagem do gene, no qual o aumento do número de moléculas ERG11 impede a saturação pelos azóis (PEREIA; PATTERSON, 2002).

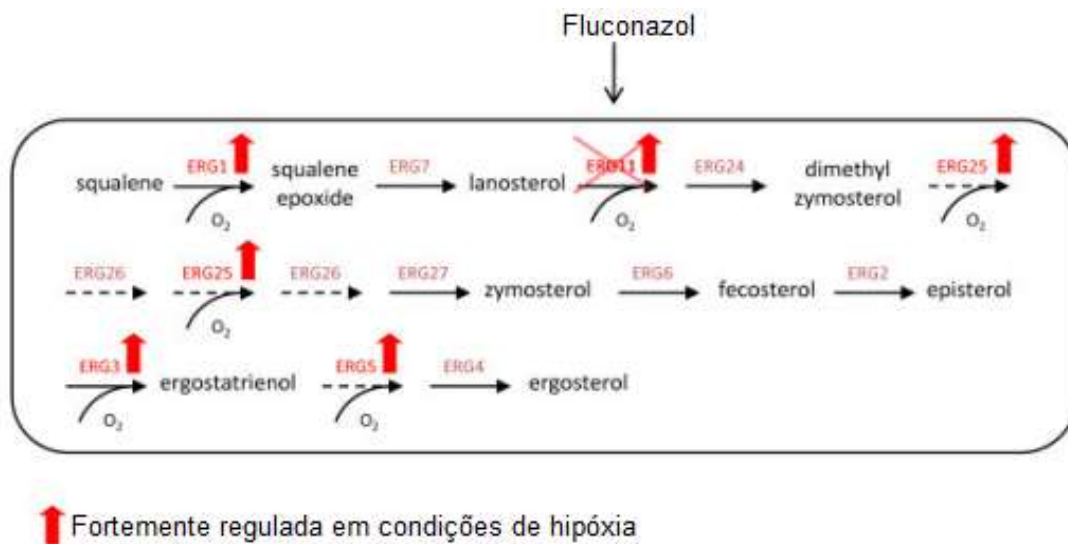


Figura 7: Representação esquemática da via biossintética do ergosterol e inibição pelo fluconazol. Ilustração da etapa inibida pelo fluconazol (ERG11). As setas vermelhas destacam os genes que são regulados positivamente em um isolado de *Pichia pastoris* sob condições de hipóxia.

Fonte: Baumann *et al.*, 2011.

As culturas de fungos, assim como as de outros micro-organismos, podem ser heterogêneas, ou seja, compostas de subpopulações. Essa diversidade reflete diferenças moleculares, que podem

conferir perfis distintos de resistência observados *in vitro*, o qual se denomina heteroresistência (FALAGAS *et al.*, 2008). Heteroresistência em *C. neoformans* pode envolver aneuploidias cromossômicas, aumentando o número de cópias dos genes de resistência a drogas, resultando numa elevada transcrição do gene ERG11 (PEREA; PATTERSON, 2002). Poucos estudos foram realizados em *C. gattii* e, portanto, os genes que regulam a sua composição foram inferidos a partir de estudos de *C. neoformans*.

Os genomas de fungos abrigam numerosas proteínas ABC (ATP-binding cassette) localizadas em vários compartimentos celulares, como a membrana plasmática, vacúolos, peroxissomos e mitocôndrias. A maioria dessas proteínas foram inicialmente descobertas por sua capacidade de conferir resistência a uma grande variedade de drogas (Figura 8), um fenômeno chamado MDR (*Multiple drug resistance*). Estudar os mecanismos subjacentes de MDR em levedura tem importância, pois as proteínas ABC podem conferir resistência a drogas em fungos patogênicos (KLEIN *et al.*, 2011).

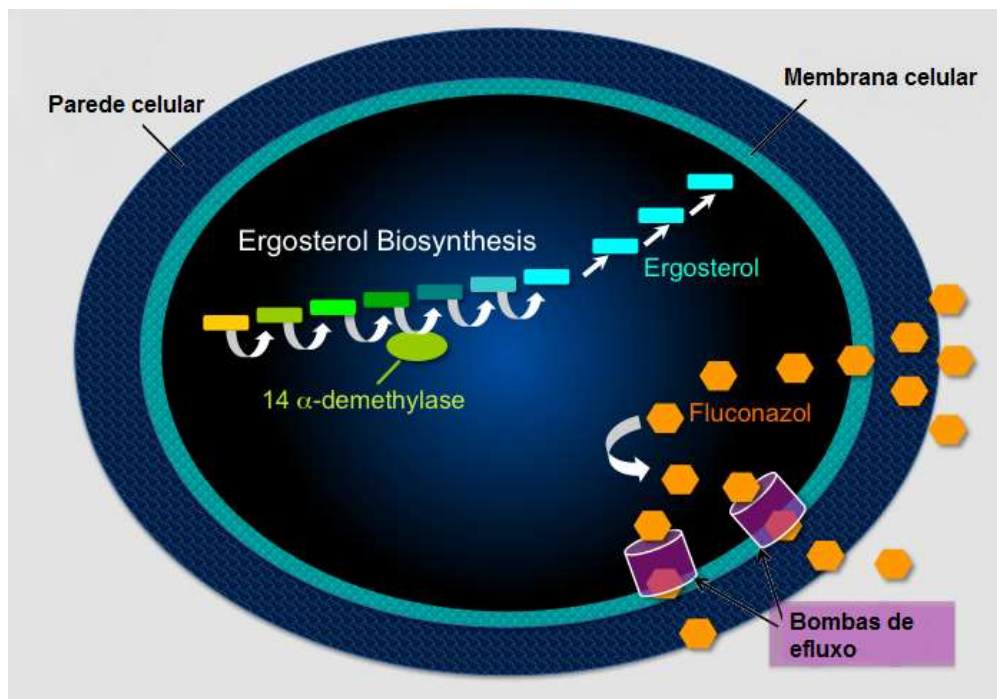


Figura 8: Mecanismo de ação das bombas de efluxo. Um dos mecanismos de resistência ao fluconazol é por meio de bombas de efluxo de drogas causado por transportadores de membrana plasmática, como MDR e PDR11. A finalidade da bomba de efluxo é diminuir a concentração intracelular de fluconazol. Fonte: White *et al.*, 1998.

As proteínas ABC são frequentemente responsáveis pela resistência aos azóis em patógenos como as MDR1 em *Cryptococcus* spp. (HOLMES *et al.*, 2012). Dois transportadores ABC de

*Cryptococcus* foram experimentalmente caracterizadas:MDR1 e PDR11, este último também denominado como AFR1. A super-expressão de MDR1, que foi inicialmente clonado por Thornewell *et al.* (1997), em um isolado de *Saccharomyces cerevisiae* resultou em aumento da resistência ao fluconazol e itraconazol, mas não para poliênicos e equinocandinas, o que indica que ele pode funcionar como uma bomba de efluxo de droga (NIIMI *et al.*, 2006). PDR11 foi identificado como um gene que foi superexpresso em um isolado com resistência gerada *in vitro* a azóis e sua supressão aboliu o fenótipo de resistência (POSTERARO *et al.*, 2003). Além disso, a superexpressão induzida de um promotor constitutivamente ativo de PDR11 em uma cepa suscetível a drogas resultou em aumento da resistência a azólicos *in vitro* e durante a infecção experimental, enquanto que a supressão de PDR11 na mesma cepa causou hipersusceptibilidade ao azólico (SANGUINETTI *et al.*, 2006). Utilizando *C. gattii* knockout para MDR1 e PDR11 foi demonstrado um papel crucial do PDR11 na susceptibilidade ao fluconazol. A CIM de fluconazol no tipo selvagem foi de 32 ug/ml, enquanto que no isolado pdr11 $\Delta$  foi de <0,03 ug / ml, e reverteu para 32 ug / ml para o isolado reconstituído (YANG *et al.*, 2016).

## 2.6 Resposta inflamatória do hospedeiro na criptococose

Numa infecção fúngica, a limitação e eliminação da criptococose são principalmente dependentes de células da imunidade inata, como as células dendríticas (DC), células natural killer (NK) e neutrófilos. Resumidamente, a infecção por *Cryptococcus* sp. induz a secreção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo interferon de tipo I (IFN do tipo I), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) e interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-6.

Apesar da descoberta dos interferons (IFN), o estudo dos mesmos se mantém até hoje como uma área de pesquisa altamente atrativa. Atualmente, os IFN são divididos em três subfamílias: IFN dos tipos I, II e III. A subfamília do tipo I compreende os IFN  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\omega$ ,  $\kappa$ , e  $\tau$ . A subfamília do tipo II compreende somente o IFN  $\gamma$ , envolvido principalmente na modulação da resposta imune (CHAWLA-SARKAR *et al.*, 2003; BONJARDIM *et al.*, 2009; TRINCHIERI, 2010). Finalmente, IFN do tipo III é composta pelos IFN  $\lambda$ , também conhecidos como interleucinas IL-29 ( $\lambda$ 1), IL-28a ( $\lambda$ 2) e IL-28b ( $\lambda$ 3). Essas subfamílias são descritas como mediadoras da potente atividade antiviral e do controle da proliferação celular. IFN do tipo I foi relacionado como crucial para regulação imune numa infecção por *Cryptococcus neoformans* (BIONDO *et al.*, 2008; BIONDO *et al.*, 2011 QIN *et al.*, 2014).

A ação de IFNs é mediada pela capacidade de induzirem a expressão de uma série de genes (>300 genes) por meio da ativação da via JAK/STAT (CHAWLA-SARKAR *et al*, 2003). Nesta via, a ligação de IFNs do tipo I e III aos receptores formados pelas proteínas IFNAR1/IFNAR2 e IL-10R2/IFNLR1, respectivamente, leva à fosforilação e interação de STAT1 e STAT2 (Figura 9). O heterodímero formado interage fisicamente com IRF9, formando o complexo conhecido como ISG3, que por meio da interação com o elemento ISRE no DNA, promove a expressão de genes induzidos por interferon (MX), como o MX1 e MX2, e de outros genes importantes para a resposta de imunidade inata (GOUJON *et al*, 2013).

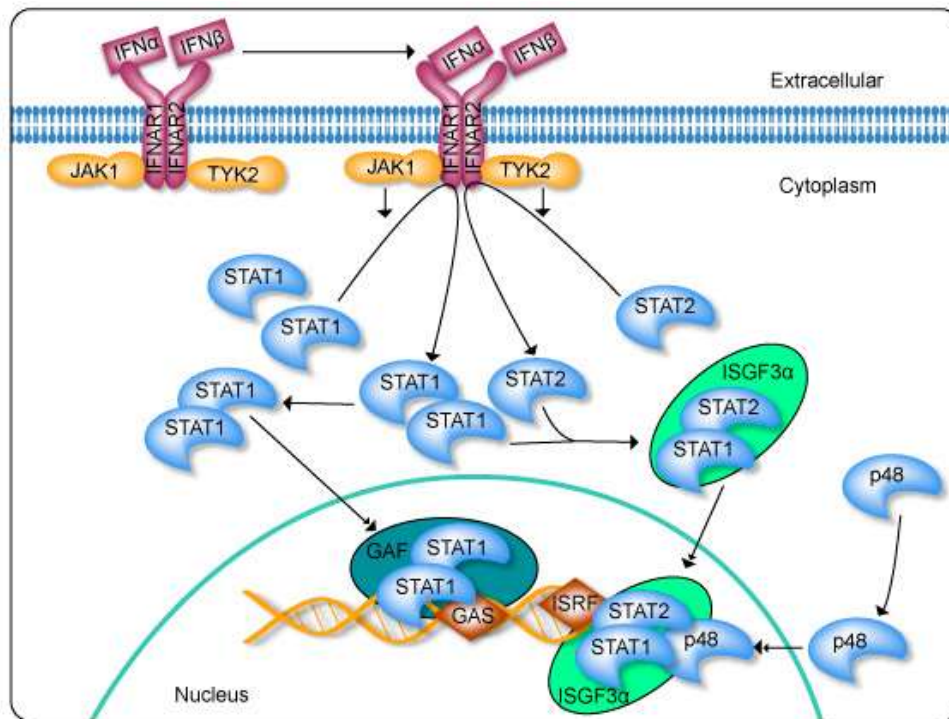


Figura 9: Via de sinalização de IFN alfa e IFN beta. IFNs são citocinas pleiotrópicas que apresentam atividades biológicas importantes, incluindo antivirais, antiproliferativas, anti-tumoral e efeitos imunomoduladores. IFN alfa e IFN beta ligam-se ao receptor de IFN tipo I (IFN-alfa / beta receptor) que consiste em duas subunidades, receptor 1 (IFNAR1) e receptor 2 (IFNAR2). A sinalização ocorre por meio de um complexo de IFN com Receptor consiste em duas cadeias alfa (receptor de tipo I), em complexo com Jak1 e Tyk2. Estas quinases fosforilam Stat1 e Stat2, respectivamente. Fonte: [http://www.genecopoeia.com/product/search/pathway/h\\_ifnaPathway.php](http://www.genecopoeia.com/product/search/pathway/h_ifnaPathway.php) [19/08/2016 às 20h00].

A proteína codificada pelo gene MX2 apresenta uma conformação nuclear e citoplasmática e é um membro das grandes dinaminas GTPases, uma superfamília que inclui proteínas envolvidas em processos celulares que necessitam de remodelação da membrana, tais como transporte vesicular e

citocinese, bem como na resistência aos patógenos intracelulares (GOUJON *et al*, 2013). Esta proteína é regulada pelo IFN alfa, mas não possui atividade antiviral. Além disso, o perfil de expressão de MX2 em monócitos derivados de macrófagos (MDM) por PCR quantitativa confirmou a indutibilidade a IFN $\alpha$ , bem como a expressão preferencial em células induzidas por IFN $\alpha$  que apresentem resistência a infecção. Assim, MX2 é necessária para a plena eficácia do IFN  $\alpha$  (KIM *et al*, 2012).

Infecção por *Cryptococcus* induz forte secreção de IFN do tipo I. No entanto, as respostas imunitárias inatas são insuficientes na defesa do hospedeiro contra a infecção por fungos e a defesa é dependente da célula T helper (Th) 17 na resposta imune (NAKAMURA *et al*, 2006). QIN *et al* (2014) demonstraram em estudo *in vitro* que o IFN do tipo I foi identificado como a citocina de resposta precoce para infecção por *Cryptococcus neoformans*, e ainda que IFN do tipo I mostrou-se ser essencial para a secreção de interleucina (IL)-17A em células T. Estudos mostraram que o aumento da produção de IL-17A, uma citocina pró-inflamatória, que é predominantemente segregada por células T CD4 +, está associado com a carga criptocócica. Além disso, IL-17A pode também aumentar a quimiotaxia de neutrófilos (BETTELLI *et al* 2006; PECK; MELLINS, 2010).

A imunidade mediada por células também é determinante na defesa do hospedeiro contra a criptococose. O pulmão é a porta de entrada para este patógeno, sendo os macrófagos alveolares um dos tipos celulares capazes de inibir e destruir o fungo (DIAMOND *et al.*, 1972; REARDON *et al.*, 1996). Durante o início do processo de infecção, células T produzem citocinas ativadoras de macrófagos, como TNF  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 e IFN  $\gamma$ , com formação de granuloma, e destruição do fungo intracelular ou contido no estado de dormência (FELDMESSER *et al.*, 2001). Contudo, *C. neoformans* é também capaz de crescer no meio extracelular, resistindo à fagocitose com a produção de fatores específicos que bloqueiam a sua adesão e internalização pela célula fagocítica, incapacitando o reconhecimento e o desenvolvimento da resposta pelo sistema imune do hospedeiro, podendo assim sobreviver e multiplicar-se tanto intra como extracelularmente (DEL POETA, 2004; MA *et al.*, 2006; ORSI *et al.*, 2009).

A imunidade mediada por células contra patógenos intracelulares, como *C. gattii*, requer a presença de IFN  $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2, IL-12 e baixos níveis de IL-4 e IL-10 (MARIANO *et al.*, 2003; SHAO *et al.*, 2005; QIN *et al*, 2014). Alterações nas células T e também nas células dendríticas foram identificadas como um fator predisponente para as formas mais graves da criptococose com rápida progressão e disseminação (BUENTKE; SCHEYNIUS, 2003). A forte associação da diminuição ou disfunção de células T CD4 com a criptococose é testemunho da importância particular desta célula imune a defesas do hospedeiro (MANSOUR *et al.*, 2011)



Frente a uma infecção, o recrutamento e a ativação de leucócitos são umas das reações do organismo. Grande parte deste processo é coordenada pela produção de quimiocinas, citocinas com propriedades quimiotáticas, capazes de atrair seletivamente subpopulações celulares específicas para o local de infecção (DEBENEDICTIS *et al.*, 2001 ). Estudos em modelo experimental identificaram algumas quimiocinas (MIP-1 $\alpha$ , MCP-1 e IP-10) em associação com as respostas imunológicas protetoras desenvolvidas contra *C. neoformans* (KAWAKAMI *et al.*, 1999; HUANG *et al.*, 2000; OLSZEWSKI *et al.*, 2000; GOLDMAN *et al.*, 2001). A presença de MIP-1 $\alpha$  é fundamental para a prevenção do desenvolvimento da pneumonia eosinofílica e da disseminação do *C. neoformans* para o cérebro em modelo animal (OLSZEWSKI *et al.*, 2001).

Micróglia são macrófagos residentes no sistema nervoso central e são responsáveis pela primeira linha de defesa contra agentes da criptococose neste local (MARIANI; KIELIAN, 2009). A micróglia humana produz MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  em resposta à infecção por *C. neoformans*, sendo um importante mecanismo de defesa, mas que pode ser inibido pelos polissacarídeos presentes na cápsula do fungo (GOLDMAN *et al.*, 2001).

A gravidade da doença e o prognóstico na criptococose são dependentes, em grande parte, da integridade do sistema imune do hospedeiro e das características próprias de cada espécie de *Cryptococcus* (WORMLEY JR; PERFECT, 2005). Alguns estudos sobre criptococose experimental mostraram diferenças de comportamento entre as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* no que se refere ao infiltrado neutrofílico, tempo de início de fagocitose e taxa de ligação de C3 aos componentes da cápsula, sugerindo que *C. gattii* parece ser mais difícil de ser fagocitado (WASHBURN *et al.*, 1991). O maior tamanho da cápsula de polissacarídeos de *C. gattii* também deve contribuir para uma menor ativação da via alternativa do sistema do complemento, levando a uma maior dificuldade de tratamento da infecção causada por estes sorotipos (WASHBURN *et al.*, 1991; YOUNG; KOZEL, 1993; DONG; MURPHY, 1995).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar os fatores de resistência ao FLC em modelo murino de criptococose causada por *Cryptococcus gattii*

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a evolução clínica da criptococose em modelo murino infectado por um isolado clínico (L27) de *Cryptococcus gattii* susceptível ao fluconazol. Isto inclui:
  - a) Alterações dos parâmetros comportamentais;
  - b) Determinar o número de unidades formadoras de colônias em cultivo no pulmão e cérebro;
  - c) Determinar in vitro a expressão de genes de IFN alfa, IFN beta e MX2 no pulmão e cérebro;
  - d) Avaliar as seguintes características nas colônias recuperadas:
    - Susceptibilidade ao fluconazol;
    - Expressão dos genes MDR1, PDR11, ERG11, UXS1 e Cap59
    - Perfil proteômico.

#### 4. CAPÍTULO 1

##### **A sub-dose of fluconazole alters the virulence of *Cryptococcus gattii* during murine cryptococcosis and modulates type I interferon expression**

Alide Caroline Lima Fontes<sup>1</sup>, Danilo Bretas Oliveira<sup>2</sup>, Juliana Ribeiro Alves Santos<sup>1</sup>, Hellem Cristina Silva Carneiro<sup>1</sup>, Noelly de Queiroz Ribeiro<sup>1</sup>, Lorena Vívien Neves de Oliveira<sup>1</sup>, Vanessa Abreu Barcellos<sup>3</sup>, Tatiane Alves Paixão<sup>4</sup>, Jonatas Santos Abrahão<sup>2</sup>, Maria Aparecida Resende-Stoianoff<sup>1</sup>, Marilene Henning Vainstein<sup>3</sup>, Daniel Assis Santos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil

<sup>2</sup>Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil

<sup>3</sup>Laboratório de Biologia de fungos de importância médica e biotecnológica, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>4</sup>Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil

Manuscrito aceito para publicação pelo periódico Medical Mycology; identificação N°MM-2016-0065.R1, aceito em 15 de maio de 2016, publicado em 2 de agosto de 2016.

Neste trabalho foram investigadas as consequências de sub-doses de fluconazol durante o tratamento da criptococose na resposta inflamatória murina e nos fatores de virulência de *Cryptococcus gattii*. Foram avaliados o comportamento dos camundongos e a expressão de interferon do tipo I durante o tratamento; os fatores de virulência e susceptibilidade ao fluconazol das colônias recuperadas dos animais. A partir dos resultados, foi constatado que a sub-dose de fluconazol prolongou a sobrevivência dos camundongos, mas a morbidade da criptococose foi maior nos animais tratados, assim como houve um aumento na concentração inibitória mínima do fluconazol, tamanho da cápsula e melanização de *C. gattii* recuperados. Como conclusão, a subdose de fluconazol altera os fatores de virulência do fungo e a susceptibilidade a esteazol, conduzindo a uma alteração na resposta inflamatória do hospedeiro e ao aumento da morbidade.



## Original Article

## A subdose of fluconazole alters the virulence of *Cryptococcus gattii* during murine cryptococcosis and modulates type I interferon expression

Alide Caroline Lima Fontes<sup>1</sup>, Danilo Bretas Oliveira<sup>2,3</sup>,  
Juliana Ribeiro Alves Santos<sup>1,4</sup>, Hellem Cristina Silva Carneiro<sup>1</sup>,  
Noelly de Queiroz Ribeiro<sup>1</sup>, Lorena Vivien Neves de Oliveira<sup>1</sup>,  
Vanessa Abreu Barcellos<sup>5</sup>, Tatiane Alves Paixão<sup>6</sup>,  
Jonatas Santos Abrahão<sup>2</sup>, Maria Aparecida Resende-Stoianoff<sup>1</sup>,  
Marilene Henning Vainstein<sup>5</sup> and Daniel Assis Santos<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil, <sup>2</sup>Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil, <sup>3</sup>Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Minas Gerais, Brazil, <sup>4</sup>Laboratório de Micologia, Universidade Ceuma (UNICEUMA), São Luís, Maranhão, Brazil, <sup>5</sup>Laboratório de Biologia de fungos de importância médica e biotecnológica, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil and <sup>6</sup>Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil

\*To whom correspondence should be addressed. Daniel Assis Santos, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 31270-901. Tel: +55 31 3409 2758; Fax: +55 31 3409 2733; E-mail: [das@ufmg.br](mailto:das@ufmg.br)

Received 1 March 2016; Revised 26 April 2016; Accepted 15 May 2016

### Abstract

Cryptococcosis is an invasive infection caused by yeast-like fungus of the genera *Cryptococcus* spp. The antifungal therapy for this disease provides some toxicity and the incidence of infections caused by resistant strains increased. Thus, we aimed to assess the consequences of fluconazole subdoses during the treatment of cryptococcosis in the murine inflammatory response and in the virulence factors of *Cryptococcus gattii*. Mice infected with *Cryptococcus gattii* were treated with subdoses of fluconazole. We determined the behavior of mice and type 1 interferon expression during the treatment; we also studied the virulence factors and susceptibility to fluconazole for the colonies recovered from the animals. A subdose of fluconazole prolonged the survival of mice, but the morbidity of cryptococcosis was higher in treated animals. These data were linked to the increase in: (i) fluconazole minimum inhibitory concentration, (ii) capsule size and (iii) melanization of *C. gattii*, which probably led to the increased expression of

type I interferons in the brains of mice but not in the lungs. In conclusion, a subdose of fluconazole altered fungal virulence factors and susceptibility to this azole, leading to an altered inflammatory host response and increased morbidity.

**Key words:** systemic mycosis, virulence factors, resistance, treatment, inflammatory response.

## Introduction

*Cryptococcus gattii* is the main etiological agent of cryptococcosis in immunocompetent individuals.<sup>1</sup> The infection is acquired after inhaled cryptococci penetrate lung tissue, reproduce, enter the bloodstream, and disseminate to other organs, often the central nervous system (CNS).<sup>2,3</sup> The main virulence factors of this fungus are the polysaccharide (PS) capsule, melanin, and urease.<sup>4</sup> The PS capsule is antiphagocytic and serves as an antioxidant<sup>5</sup>; its structure is highly variable and undergoes changes in size, charge, and rearrangements during infection.

The treatment of cryptococcosis causes concern, due to drug side effects and the emergence of resistant fungal isolates to commonly used antimicrobials, for example, amphotericin B and fluconazole.<sup>6–10</sup> Specifically, the resistance of *C. gattii* to fluconazole can occur *in vivo*<sup>11</sup> and *in vitro*<sup>12</sup> by mutation and/or overexpression of the ERG11 gene, the overexpression of efflux pumps, alterations in enzymes of the pathway of ergosterol synthesis and decreased permeability of the plasma membrane to the drug.<sup>13–15</sup> Recently, it has been shown that the antifungal resistance in *Cryptococcus* may be entirely dependent on PDR11.<sup>16</sup>

Sionov et al.<sup>12</sup> characterized the heteroresistance to fluconazole in a murine model and correlated this with increased fungal virulence<sup>10</sup>; heteroresistant *C. gattii* to itraconazole also presented a high virulence profile.<sup>17</sup>

However, little is known about the consequences of fluconazole sub-doses in cryptococcosis, since the drug can act as a selective agent of more resistant microbial populations and can also alter fungal virulence factors. In this study, we investigated the effect of fluconazole subdoses in the murine response and on the virulence of *C. gattii*. The results suggested an altered expression of type I interferon, a reduced drug susceptibility, and higher *C. gattii* virulence when mice were treated with fluconazole subdoses.

## Materials and Methods

*Cryptococcus gattii*, antifungal drug susceptibility testing and dose administered in mice

We tested the L27/01 strain of *C. gattii* from the culture collection of the Laboratório de Micologia/Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. The minimum inhibitory concentration (MIC) for fluconazole (Sigma-Aldrich,

St. Louis, Missouri, USA) was determined by the microdilution method.<sup>18,19</sup> Mice infected with *C. gattii* were treated with 10 mg/kg/day fluconazole, a current dose used in animal studies, which is equivalent to 50 mg/kg/day for the treatment of human cryptococcosis.<sup>20</sup> This concentration can be considered a drug subdose, since 200–400 mg/kg/day fluconazole is recommended for humans suffering from cryptococcosis.<sup>21–23</sup>

## Intratracheal infection, behavioral analysis, colony forming units and histopathology

Female 6- to 8-week-old C57BL/6 mice were used in all experiments. The animal studies were approved by the Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) from the Universidade Federal de Minas Gerais (Protocol 312/2012). Mice were provided with food and water *ad libitum* in a controlled environment with a 12-h light/dark photoperiod. Any mice that appeared moribund (e.g., intense piloerection, convulsions, lack of locomotor activity) were euthanized under anesthesia by cervical dislocation. Mice (n = 10/group) were anesthetized intraperitoneally (i.p.) with ketamine (60 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and were then inoculated intratracheally (i.t.) with 30  $\mu$ l L27/01 strain ( $1 \times 10^6$  CFU/animal) or PBS (control). Animals were monitored twice daily for survival. Fluconazole (10 mg/kg/day) was administered daily i.p., from 10 to 15 days post-infection (d.p.i.). The nontreated control group was administered with PBS. The SHIRPA protocol for the behavioral and functional assessment of neurological diseases was used. The tasks were grouped into five functional categories: neuropsychiatric state, motor behavior, autonomic function, muscle tone and strength, and reflex and sensory function.<sup>24,25</sup> The mice were blinded, examined daily, and the score for each functional category was calculated as the total of the evaluated parameters<sup>24,25</sup> using EpiData 3.1 software.

Other groups of mice were anesthetized i.p., infected, and euthanized to obtain lung and brain material at 15 d.p.i. Organ homogenates were plated on to Sabouraud Dextrose Agar, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA (SDA), to determine the CFU per gram of tissue. The colonies recovered from nontreated mice were named L27/NT, and those recovered from treated animals were named L27/FLC. A mean of five colonies recovered from the lungs and

**Table 1.** Sequences of the primers used in this study for qPCR of genes from mice (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  and MX2) and from *C. gattii* (*MDR1*, *PDR11*, *ERG11*, *UXS1*, and *CAP59*).

Primer	Forward	Reverse
IFN $\alpha$	GGA CAG GCA GGA CTT TGG ATT	GCC TTC TGG ATC TGC TGG TTA
IFN $\beta$	ACACCAGCCTGGCTTCCATCA	AGGGCTGTGGTGGAGAAGCAC
MX2	TGAATGCCTACCGCCAAGA	AATACTGGATGATCAAGGGAACGT
<i>MDR1</i>	CGTCGACTCCGAGAAGGA	CTCGCGACCAACGCTTATTG
<i>PDR11</i>	TGGCTGATGCCATGATTGGT	CTTGGCAGCAAGTTCCACAC
<i>ERG11</i>	TGGCGTCTCTCAAATGGACC	ATCCCTTTTCGTCGTGCCAT
<i>UXS1</i>	TCACCATCCTCGAGTTTGCC	GAGGGTTGCCTTCCTCCTTC
<i>CAP59</i>	CGTACCCGTGGTCTGTCAA	TTGTCACGGAGTTCGTGGAG

brain of each animal were used to determine the fluconazole MIC. The lungs and brain were also stained with hematoxylin-eosin (HE).

#### Extraction of RNA, reverse transcription and real-time PCR for organs and for *C. gattii*

The mRNA levels of interferon- $\alpha$  (IFN), IFN- $\beta$ , and MX2 were determined for the lungs and brain from five animals for each group, whereas the levels of mRNA for the efflux pumps *PDR11* and *MDR1*, the ergosterol enzyme *ERG11*, and the capsule genes *CAP59* and *UXS1* were determined in the five colonies recovered from the organs of each animals group. The RNA from lungs and brain was isolated using Trizol (Invitrogen), and RNA from L27/NT and L27/FLC strains was extracted using the RNeasy kit (Qiagen, Germany). The RNA concentration was assessed by Nanodrop (Thermo Fisher Scientific).

The cDNA was prepared using MMLV (Promega, Madison, WI, USA) and oligo-dT (Qiagen, Germany). Real-time PCR (qPCR) was performed in a StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem, USA, 5 ml) as a reaction mix, supplemented with 200 nM of each primer and 1  $\mu$ l cDNA template to a final volume of 10  $\mu$ l. All experiments were performed using three independent cultures, and each cDNA sample was analyzed in triplicate for each primer pair. A melting curve analysis was performed at the end of the reaction to confirm the presence of a single PCR product. Data were normalized to actin cDNA amplified in each set of PCR experiments. Analyses were performed using the delta-delta Ct method. The primers used in these analyses are listed in Table 1.

#### Phagocytosis assays

The J774.A1 murine macrophage ( $1 \times 10^6$ ) cells in DMEM supplemented with 10% FBS was seeded into 12-well

culture plates and activated with 100 U/mL INF- $\gamma$  (Sigma) and 500 ng/ml LPS (Sigma) for 18 h at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. *Cryptococcus gattii* cells were opsonized with anti-GXM antibody 18B7 (1  $\mu$ g/ml) for 1 h at 37 °C, centrifuged, and the pellet was resuspended in 500  $\mu$ l FITC solution (500  $\mu$ g/ml) and incubated for 10 min at room temperature. The cells were washed several times with PBS and counted in a Neubauer Chamber. Then,  $1 \times 10^7$  yeast cells/ml were added to the wells containing the macrophage, and these were incubated for 2 h at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. The wells were then washed three times with PBS and treated with Trypan Blue (Sigma). The cells were collected by scraping and were analyzed with a Guava easyCyte Flow Cytometer (Merck Millipore) by measuring the green fluorescence of 5,000 events.<sup>26</sup> A second plate was incubated under identical conditions for 24 h to evaluate the antifungal activity. After incubation, the wells were washed three times with PBS, and the cells were lysed with sterile ice-cold water and subsequently plated onto YPD plates for CFU determination. The survival index was obtained by normalizing the CFU counts after 24 h of interaction to the fluorescence units obtained in the flow cytometric analysis following 2 h of interaction.<sup>27</sup>

#### Melanization and laccase assay

*C. gattii* cells were grown in chemically defined minimal medium (15 mM dextrose, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 29.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 13 mM glycine, 3  $\mu$ M thiamine and agar, pH 5.5) with or without 1 mM L-DOPA (Sigma-Aldrich) and incubated at 30 °C in the dark. Cultures were examined daily to monitor growth and pigment production. For laccase production, yeast cells recovered from treated (L27/FLC) and nontreated mice (L27/NT) were grown in YPD, washed twice, and transferred to asparagine medium with 0.1% dextrose (7.6 mM L-asparagine, 22.1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 3.0 mM thiamine-HCl, 4.1 mM biotin, pH 5.6). After 24 h,  $1 \times 10^7$  cells were inoculated in 10 mM

L-DOPA in PBS. After incubation at 30 °C for 90 min, the cells were pelleted, and the OD of the supernatant was recorded at 475 nm (0.001 corresponds to 1 U laccase). The laccase assays were performed in triplicate with a biological replicate.<sup>28</sup>

### Capsule analysis

For capsule induction, L27/NT and L27/FLC cells recovered from the organs of mice were immediately grown at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> in minimal medium (glucose, 15 mM; MgSO<sub>4</sub>, 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 29.4 mM; glycine, 13 mM; thiamin, 13 μM; pH 5.5) for 72 hours. The capsule sizes of 100 yeast cells of L27/NT and L27/FLC (in Indian ink) were measured using ImageJ 1.40 g (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD) with an optical microscope (AXIOPLAN, Carl Zeiss).

### Statistical analysis

Statistical analysis of all data was performed using GraphPad Prism version 5.0 with  $P < .05$  as the significance threshold. The survival curve was plotted using Kaplan–Meier analysis, and the results were analyzed using the Long Rank test. The SHIRPA data were analyzed with the Wilcoxon Rank-Sum Test.<sup>25</sup> The other results were analyzed by analysis of variance (ANOVA), the nonparametric Friedman test, and the Student *t*-test.

## Results

### A subdose of fluconazole prolongs the survival of mice but cause higher morbidity

Treated mice survived longer than nontreated mice (Figure 1A). Furthermore, the treatment reduced the fungal burden in the lungs and the brain (Figure 1B). No difference was observed in the distribution of yeasts in the lung parenchyma in the histological analysis (Figure 1C–F), although foamy macrophages were more evident in the treated group. Indeed, the behavioral alterations were more prominent in the treated groups, which performed worse in the behavioral tests (Figure 1G–K). Only the neuropsychiatric state was equally altered in treated and nontreated groups (Figure 1I).

### The expression of Type I IFNs is increased in the brain but not in the lungs of treated mice

The expression of type I IFN was different between the organs of the evaluated groups. The FLC group showed

an increase in IFN levels in the brain and lungs compared to the NT group (Figure 2). The data are expressed as the quotient of the test over the control. There was significant difference between the FLC and NT groups for IFN β in the lungs. However, expression was higher in the brain of treated mice compared to that in the NT group for IFN α and IFN β.

### *Cryptococcus gattii* from treated mice was more internalized and had a higher intracellular proliferation rate

The *C. gattii* strain from treated mice (L27/FLC) was more phagocytosed (Figure 3A) and had an increased ability to survive within macrophages (Figure 3B) than the *C. gattii* strain from nontreated mice (L27/NT).

### Subdoses of fluconazole lead to an increase in the minimum inhibitory concentration

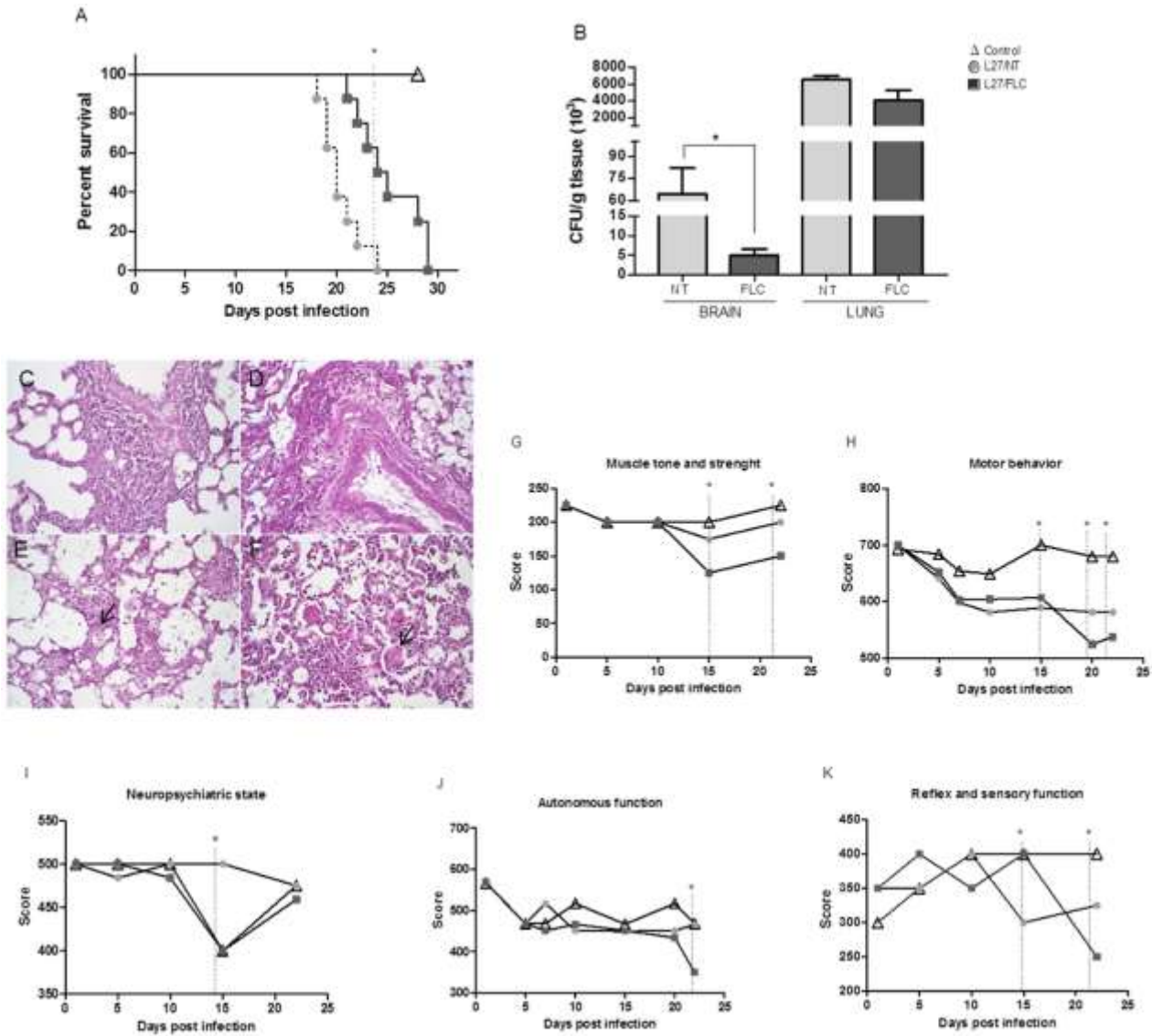
The MICs of fluconazole based on the percentage of colonies recovered from treated and nontreated groups of mice are shown in Figure 4. The MICs of fluconazole against the L27 strain before infection varied from 8.0 to 16.0 mg/l. After intratracheal infection, the MIC for the L27/NT strain was 16–32 mg/l, both in the lungs and the brain (Figure 4A–B). The MIC of fluconazole against the L27/FLC strain was higher in both organs (Figure 4A–B), reaching 256 mg/l.

### Subdoses of fluconazole increase the capsule size and melanization of *C. gattii*

To assess whether subdoses of fluconazole affect some virulence factors, we evaluated the levels of laccase activity and capsule size (Figure 5). There was no difference in fungal growth at 37 °C (data not shown); however, laccase activity and melanization were significantly higher in yeasts from treated animals (Figure 5A–B). The capsule size was also significantly higher in L27/FLC, either from the brain or lungs (Figure 5C–E).

### Fungal gene expression differs depending on whether *C. gattii* is recovered from the lungs or the brain

Overall, colonies recovered from the lungs of infected mice exhibited significantly higher gene expression than the control strain, whereas the strains recovered from the brain showed reduced gene expression compared to the control (Figure 6).



**Figure 1.** Survival curve (A), Colony-forming units (CFU) per gram of tissue (B), Histopathological sections stained with H&E 400× of lung and brain 15 days post-inoculation (C–F): Lungs of mice inoculated with the L27/NT strain showing mild peribronchiolar mononuclear infiltrate (C);lungs of mice inoculated with the L27/FLC strain, with low perivascular peribronchiolar mononuclear infiltrate (D); interstitial pneumonia with alveolar thickening, mononuclear inflammatory cells and foamy macrophages in nontreated mice (E); interstitial pneumonia with alveolar thickening, mixed inflammatory infiltrate and a predominance of mononuclear macrophages and giant cells in treated mice-granulomatous infiltrate (F). Assessment of the behavioral performance of uninfected mice (triangle: control), and mice infected with *C. gattii* L27/01 from the nontreated group (circles: NT) and the treated group with 10 mg/kg/day fluconazole (square: FLC) in five distinct functional categories using the SHIRPA protocol (n = six animals/group). Muscle tone (G), motor behavior (H), neuropsychiatric state (I), autonomous function (J) and reflex and sensory function (K). \**P* < .05 was considered significant compared to the control. The dotted lines show when the differences began. This Figure is reproduced in color in the online version of *Medical Mycology*.

In the lungs (Figure 6A), the expression of UXS1 and CAP59 was higher in L27/NT colonies, suggesting that the fungus might attempt to compensate for the diminished capsule size. There was no difference between PDR11, MDR1, and ERG11 in the colonies recovered from the lungs. Notably, the expression of MDR1, ERG11, and UXS1 in colonies recovered from the brain was higher in colonies of L27NT, whereas CAP59 expression was higher in colonies recovered from treated mice (L27/FLC) (Figure 6B).

### Correlations between the studied genes

We verified intriguing correlations between some studied genes, both from the fungus and from mice. Regarding gene expression in the yeast, we verified strong positive correlations between ERG11 and MDR1 ( $R^2 = 0.97, P = .004$ ) in the NT group; CAP59 and UXS1 ( $R^2 = 0.99, P = .002$ ); CAP59 and MDR1 ( $R^2 = 0.98, P = .014$ ); and UXS1 and MDR1 ( $R^2 = 0.98, P = .03$ ) in the treated group. These



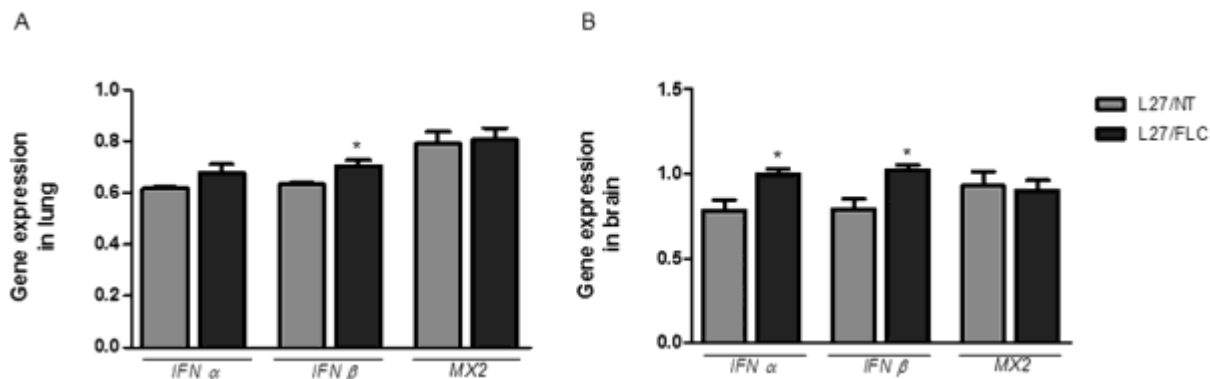


Figure 2. Expression of IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , and MX2 in the lung (A) and brain (B) from mice infected with *Cryptococcus gattii* from the nontreated group (L27/NT) and the treated group with 10 mg/kg/day fluconazole (L27/FLC). \* $P < .05$ .

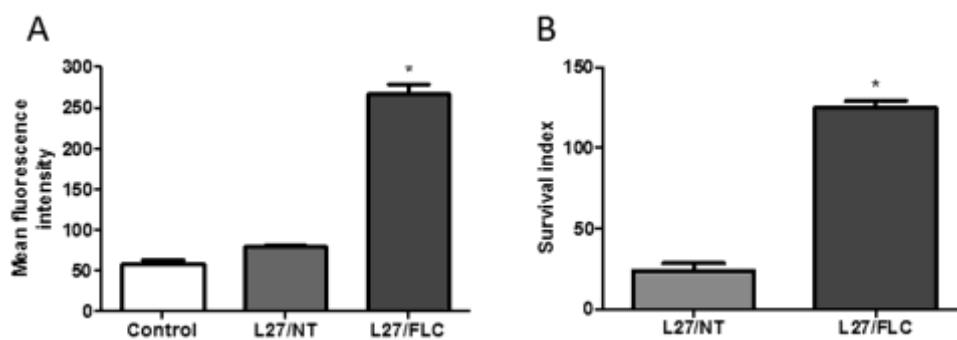


Figure 3. Flow cytometry analysis of J774.A1 macrophage infection after 2 h of interaction with FITC-labeled *Cryptococcus gattii* cells (A), the survival index estimated using the ratio between the CFU following 24 h of interaction and the fluorescence units obtained by flow cytometry following 2 h of interaction (B). \* $P < .05$ .

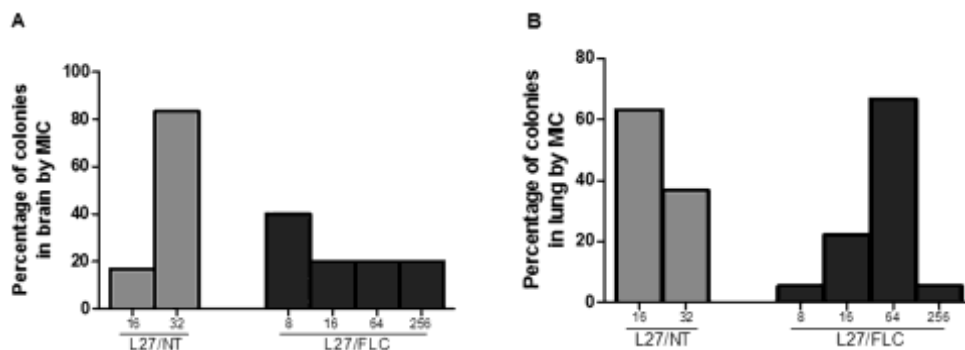


Figure 4. Minimum inhibitory concentration (MIC) (mg/l) of fluconazole based on the percentage of colonies of for *C. gattii* recovered from brains (A) and lungs (B) from infected mice from the nontreated group (L27/NT) and the group treated with 10 mg/kg/day fluconazole (L27/FLC).

data provide new insights into the integrative alterations in gene expression of *C. gattii*. When analyzing the correlation between gene expression of mice and the fungus, we verified strong negative correlations between IFN- $\beta$  and ERG11 ( $R^2 = -0.99$ ,  $P = .005$ ) in treated animals, showing that the murine inflammatory response might influence fungal ergosterol synthesis.

### Discussion

Several factors can interfere in the efficacy of antifungal agents, including drug absorption, adherence to treatment, reinfection, immunity deficiency, drug resistance and sub-therapeutic doses.<sup>29</sup> Insufficient quantities of drug delivery can lead to clinical relapses that might erroneously be

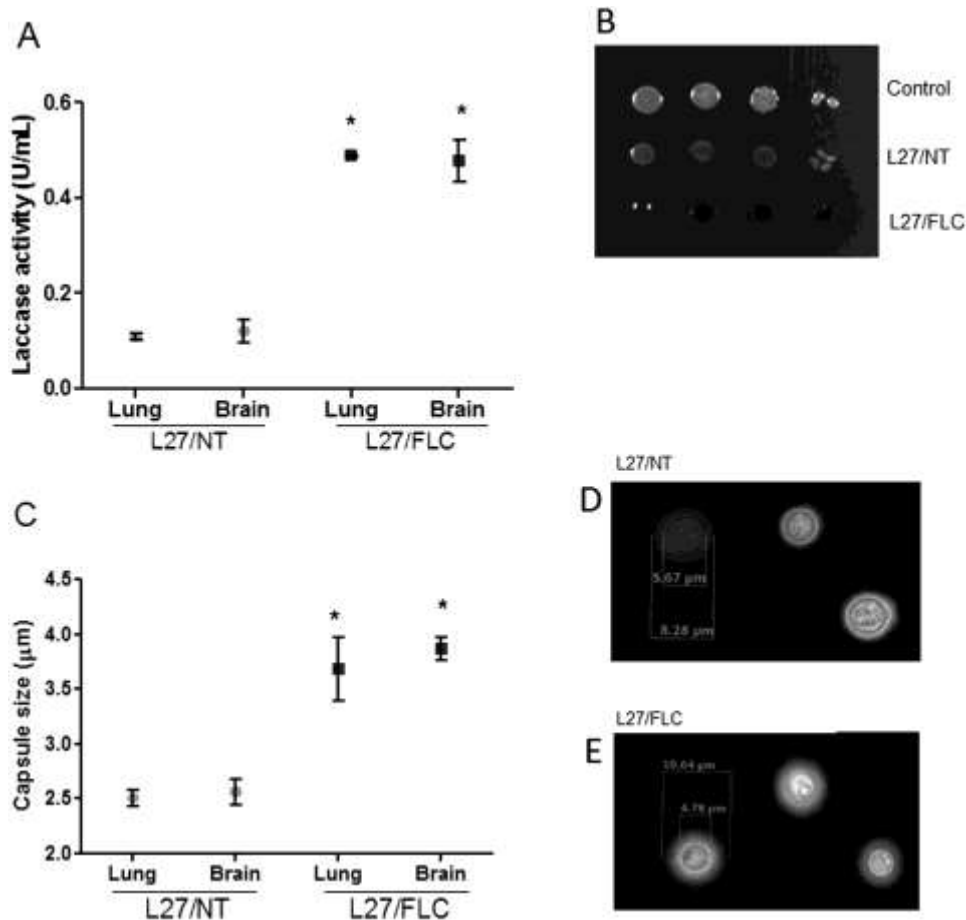


Figure 5. Laccase activity (A), melanization (B) and capsule size (C, D, E) of *C. gattii* L27/01 cells from the nontreated group (circles: L27/NT) and the group treated with 10 mg/kg/day fluconazole (square: L27/FLC), \**P* < .05.

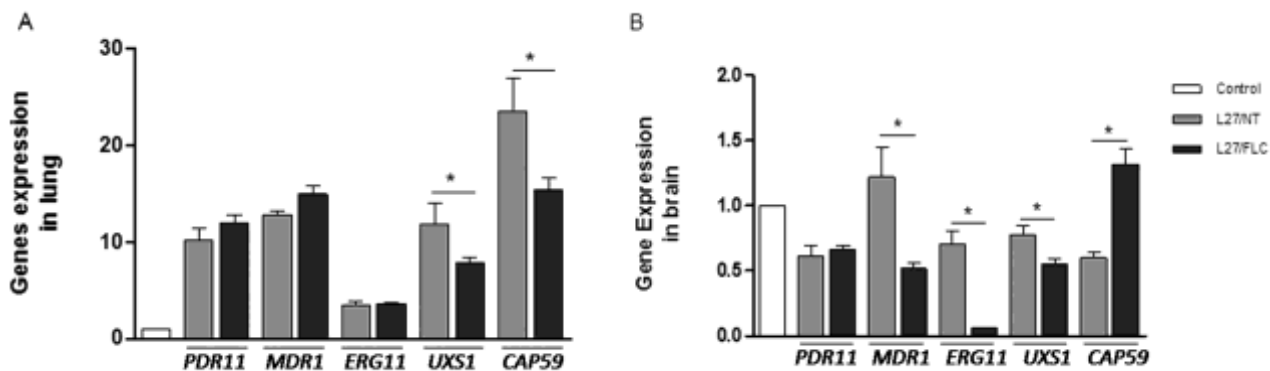


Figure 6. Expression of PDR11, MDR1, ERG11, UXS1 and CAP59 in colonies recovered from lungs (A) or brain (B) of mice infected with *C. gattii* from the nontreated group (L27/NT) and the group treated with 10 mg/kg/day fluconazole (L27/FLC). Control group: *C. gattii* cultured on Sabouraud dextrose agar. \**P* < .05.

confused with drug resistance or reinfection and cause a fatal outcome for a patient.<sup>30</sup> The treatment with 10 mg/kg/day fluconazole, a subtherapeutic dose for mice, increased the survival of animals and reduced the fungal

burden in the brain but was not able to reduce the burden in the lungs. The more rapid death of untreated animals might be due to the higher fungal burden in the brain, causing severe meningoencephalitis. Previously, it was

established that the survival of animals was dependent on the fungal burden.<sup>31</sup>

Despite the increased survival of the treated animals, they appeared more moribund than untreated mice, as assessed by the behavioral analysis. This might be due to the influence of fluconazole subdoses on the virulence factors of yeast and on the inflammatory response of the host, which showed areas of granulomatous infiltrate, which is a common finding in immunocompetent hosts infected with *Cryptococcus gattii*.<sup>32,33</sup> The neuropsychiatric state category was affected in both groups and might indicate cerebral damage caused by the fungus.<sup>34</sup> Indeed, the treated group showed an increased expression of type I IFN. Recent data demonstrated that the induction of type I IFN dramatically improves host resistance against the etiologic agents of cryptococcosis by beneficial alterations in both innate and adaptive immune responses.<sup>35</sup> In addition, it was demonstrated that type I IFN induction combined with fluconazole resulted in a synergistic antifungal effect that is reflected in a reduction in the fungal burden.<sup>35</sup> This fact can be easily associated with our data on the fungal burden but also explains the higher inflammation and, consequently, the increased morbidity when animals were exposed to subdoses of fluconazole, since this might disorganize the cell structure and modify the fungal PS capsule<sup>12</sup> and cell wall, culminating in altered antigen presentation and cytokine production. Indeed, fluconazole led to the recovery of colonies with a lower susceptibility to this drug, which might be explained by the fact that *Cryptococcus* can undergo genetic changes *in vivo* by establishing a means to evade the host's defenses and antifungals.<sup>36,37</sup>

The cryptococcal interactions with phagocytes allow the pathogen to survive intracellularly and to disseminate to the central nervous system and escape.<sup>38</sup> Therefore, it is important to evaluate whether the cryptococcal strains recovered from two groups of infected mice react differently to macrophages. Similar to the situation *in vitro*,<sup>12</sup> *C. gattii* was more internalized by phagocytes in the presence of fluconazole.

Notably, we confirmed important changes in the yeast virulence factors when they were recovered from treated mice. Virulence structures allow the fungus to overcome the host defense system and cause a disease with a worse prognosis. Although fluconazole decreases the capsule and laccase activity *in vitro*, during the murine infection model, the capsule increases in size, and the laccase activity and melanization are considerably higher. The synthesis of the PS capsule of *Cryptococcus* is complex and requires many intermediates.<sup>39</sup> Many of these intermediates are encoded by the CAP genes, which are essential for virulence. The treated animals showed an increased expression of CAP59,

and yeast recovered from this group possessed larger capsules. Altogether, these virulence factors might be responsible for the increased morbidity of the treated animals.

*Cryptococcus gattii* has a high potential to develop resistance to fluconazole *in vitro*,<sup>8–10,40</sup> and the expulsion of the drug from the yeast is one of the mechanisms involved in this resistance,<sup>41</sup> together with mutations or overexpression of the *ERG11* gene. Fungal genomes harbor numerous ABC (ATP-binding cassette) proteins located in various cellular compartments, which confer resistance to a wide variety of drugs. Two *Cryptococcus* ABC transporters have been experimentally characterized: *MDR1* and *PDR11*, and these are often responsible for the resistance to the azoles in *Cryptococcus* spp.<sup>16,42</sup> Our *in vivo* results demonstrated that the differences in the expression of these genes depend on the site from where the yeast is recovered, since gene expression from L27/FLC colonies was higher in the lung, whereas colonies in the brain had a lower gene expression. Notably, the expression of *MDR1* and *ERG11* was higher in L27/NT recovered from the brain, providing another perspective on the role of these membrane transporters during the fungus–host interaction. This difference in gene expression according to the yeast site occurred for all *C. gattii* genes studied, except for the *UXS1* gene. These data suggest that these genes might not be exclusively involved in the resistance of *C. gattii* to fluconazole and might also be influenced by the host microenvironment and its particular milieu of inflammatory mediators, which determines the profile of the disease caused by the fungus. Considering that fluconazole is aneuploidogenic,<sup>43</sup> our previous work with the same strain tested here revealed no influence of this antifungal in the banding patterns generated by the pulsed field gel electrophoresis (PFGE) technique.<sup>12</sup>

The statistical correlation between fungal and mice genes revealed that the increase in type I IFN expression correlates with the decrease in *ERG11*, resulting in fungal ergosterol biosynthesis. It is possible to speculate that the synergistic action between fluconazole and type I IFN helped the host to contain the infection within the lung, causing a decrease in *ERG11* expression, to maintain fluconazole inside the cell and to avoid dissemination of the yeast. Considering only fungal gene expression, yeasts recovered from treated animals showed a strong positive association between CAP59 and UXS1. These genes together are responsible for the increased capsule size, since this association was not found in strains with smaller capsules. Moreover, the CAP59/UXS1 genes positively correlated with efflux pump genes, which validate the fact that therapy with subdoses of fluconazole can affect important virulence factors of the fungus.

In conclusion, we provide new insights concerning the treatment of cryptococcosis with fluconazole and demonstrate that a subdose can influence the virulence factors of the fungus and the inflammatory response of the host.

## Funding

This study was supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Grant PPM-00117-14) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Grant 472438/2013-1). D.A.S. is a research fellow of the CNPq (Grant 305154/2014-1).

## Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and the writing of the paper.

## References

- Chandler FW, Watts JC. Cryptococcosis. In: Connor DH, Chandler FW, Schwartz DA, Manz HJ, Lack EE, eds. *Pathology of infectious diseases*, Stamford: Appleton and Lange. 1997: 989–997.
- Perfect JR. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am* 1989; **3**: 77–102.
- Chaturvedi V, Chaturvedi S. *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen. *Trends Microbiol* 2011; **19**: 564–571.
- Dixit A, Carroll SF, Qureshi ST. *Cryptococcus gattii*: an emerging cause of fungal disease in North America. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009; 131–144.
- O’meara TR, Alspaugh JA. The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. *Clin Microbiol Rev* 2012; **25**: 387–408.
- Bennett JE. Antifungal agents. In: Goodman LS, Gilman AG, Brunton LL, Lazo JS, Parker KL eds. *The pharmacological basis of therapeutics*. Rio de Janeiro: McGraw-Hill. 2003; **48**: 1103–1118 [in Portuguese].
- Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS—100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev* 1995; **8**: 515–548.
- Soares BM, Santos DA, Kohler LM et al. Cerebral infection caused by *Cryptococcus gattii*: a case report and antifungal susceptibility testing. *Rev Iberoam Micol* 2008; **25**: 242–245.
- Govender NP, Patel J, van Wyk M et al. Trends in antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates obtained through population-based surveillance in South Africa in 2002–2003 and 2007–2008. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 2606–2611.
- Sionov E, Chang YC, Garraffo HM et al. Identification of a *Cryptococcus neoformans* Cytochrome P450 Lanosterol 14 $\alpha$ -Demethylase (Erg11) Residue Critical for Differential Susceptibility between Fluconazole/Voriconazole and Itraconazole/Posaconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 1162–1169.
- Mendes FES, Oliveira LVN, Faria ES et al. Correlation of the in vitro antifungal drug susceptibility with the in vivo activity of fluconazole in a murine model of cerebral infection caused by *Cryptococcus gattii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; **29**: 1525–1532.
- Santos JRA, Holanda RA, Frases S et al. Fluconazole alters the polysaccharide capsule of *Cryptococcus gattii* and leads to distinct behaviors in murine cryptococcosis. *Plos One* 2014; **9**: e112669.
- Perfect JR, Cox GM. Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. *Drug Resist Update* 1999; **2**: 259–269.
- Pontón J, Quindós G. Mechanisms of resistance to antifungal therapeutic. *Med Clin* 2006; **126**: 56–60 [in Spanish].
- Gast CE, Basso LR, Bruzual I et al. Azole resistance in *Cryptococcus gattii* from the Pacific Northwest: Investigation of the role of ERG11. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 5478–5485.
- Yang ML, Uhrig J, Vu K et al. Fluconazole susceptibility in *Cryptococcus gattii* is dependent on the ABC Transporter Pdr11. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **60**: 1202–1207.
- Ferreira GF, Santos JRA, da Costa MC et al. Heteroresistance to itraconazole alters the morphology and increases the virulence of *Cryptococcus gattii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 4600–4609.
- Santos JRA, Gouveia LF, Taylor ELS et al. Dynamic interaction between fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus gattii*. *Antimicrob. Agents Chemother* 2012; **56**: 2553–2558.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard M27-A3. CLSI, Wayne, PA. 2008.
- Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB Journal* 2007; **22**: 659–661.
- Saag MS, Powderly WG, Cloud GA et al. Comparison of amphotericin B with fluconazole in the treatment of acute AIDS-associated cryptococcal meningitis. *N Engl J Med* 1992; **326**: 83–89.
- Groll AH, Piscitelli SC, Walsh TJ. Clinical pharmacology of systemic antifungal agents: a comprehensive review of agents in clinical use, current investigational compounds and putative targets of antifungal drug development. *Adv Pharmacol* 1998; **44**: 343–500.
- Andriole VT. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. *J Antimicrob Chemother* 1999; **44**: 151–162.
- Lackner PR, Beer V, Heussler G et al. Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2006; **32**: 177–188.
- Pedroso VSP, Vilela MC, Santos PC et al. Development of a murine model of neuroparacoccidioidomycosis. *J Neuroparasitology* 2010; **1**: 39–44.
- Barbosa FM, Fonseca FL, Holandino C et al. Glucuronoxylomannan-mediated interaction of *Cryptococcus neoformans* with human alveolar cells results in fungal internalization and host cell damage. *Microbes Infect* 2006; **8**: 493–502.

27. Kmetzsch L, Joffe LS, Staats CC et al. Role for Golgi reassembly and stacking protein (GRASP) in polysaccharide secretion and fungal virulence. *Mol. Microbiol* 2011; **81**: 206–218.
28. Tangen KL, Jung WH, Sham AP et al. The iron- and cAMP-regulated gene *SIT1* influences ferrioxamine B utilization, melanization and cell wall structure in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology Sgm* 2007; **153**: 29–41.
29. Pittrow L, Penk A. Dosage adjustment of fluconazole during continuous renal replacement therapy (CAVH, CVVH, CAVHD, CVVHD). *Mycoses* 1999; **42**: 17–19.
30. Valerio M, Rodriguez-Gonzalez CG, Muñoz Pet et al. Evaluation of antifungal use in a tertiary care institution: antifungal stewardship urgently needed. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 1993–1999.
31. Thompson GR, III, Wiederhold NP, Najvar LK et al. A murine model of *Cryptococcus gattii* meningoencephalitis. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 1432–1438.
32. Mukhopadhyay S. Role of histology in the diagnosis of infectious causes of granulomatous lung disease. *Curr Opin Pulm Med* 2011; **17**: 189–196.
33. Shibuya K, Hirata A, Omuta J et al. Granuloma and cryptococcosis. *J Infect Chemother* 2005; **11**: 115–122.
34. Bicanic T, Wood R, Bekker LG et al. Antiretroviral roll-out, antifungal roll-back: access to treatment for cryptococcal meningitis. *Lancet Infect Dis* 2005; **5**: 530–531.
35. Sionov E, Mayer-Barber KD, Chang YC et al. Type I IFN induction via poly-ICLC protects mice against cryptococcosis. *PLoS Pathog* 2015; **11**: e1005040.
36. Posteraro B, Sanguinetti M, Sanglard D et al. Identification and characterization of a *Cryptococcus neoformans* ATP binding cassette (ABC) transporter-encoding gene, *CnAFR1*, involved in the resistance to fluconazole. *Mol. Microbiol* 2003; **47**: 357–371.
37. Orsi CF, Colombari B, Ardizzoni A et al. The ABC transporter-encoding gene *AFR1* affects the resistance of *Cryptococcus neoformans* to microglia-mediated antifungal activity by delaying phagosomal maturation. *FEMS Yeast Res* 2009; **9**: 301–310.
38. Kronstad JW, Attarian R, Cadieux B et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat Rev Microbiol* 2011; **9**: 193–203.
39. Bose I, Reese AJ, Ory JJ et al. A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* 2003; **2**: 655–663.
40. Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS—100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Microbiol. Rev* 1995; **8**: 515–548.
41. Klein C, Kuchler K, Valachovic M. ABC proteins in yeast and fungal pathogens. *Essays Biochem* 2011; **50**: 101–119.
42. Holmes AR, Keniya M V, Ivnitski-Steele I et al. The monoamine oxidase A inhibitor clorgyline is a broad-spectrum inhibitor of fungal ABC and MFS transporter efflux pump activities which reverses the azole resistance of *Candida albicans* and *Candida glabrata* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 1508–1515.
43. Yüzbaşıoğlu D, Ünala F, Yılmaz S et al. Genotoxicity testing of fluconazole in vivo and in vitro. *Mutation Res* 2008; **649**: 155–160.

## 5. CAPITULO 2

### Efeito da imunossupressão em camundongos C57BL/6 infectados com *Cryptococcus gattii* na resposta a criptococose

Alide Caroline Lima Fontes<sup>1</sup>, Hellem Cristina Silva Carneiro<sup>1</sup>, Noelly de Queiroz Ribeiro<sup>1</sup>, Lorena Vívien Neves de Oliveira<sup>1</sup>, Juliana Ribeiro Alves Santos<sup>1,3</sup>, Danilo Bretas Oliveira<sup>2</sup>, Jonatas Santos Abrahão<sup>2</sup>, Maria Aparecida Resende-Stoianoff<sup>1</sup>, Daniel Assis Santos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil

<sup>3</sup>Laboratório de Micologia, Universidade Ceuma (UNICEUMA), São Luís, Maranhão, Brasil

Neste trabalho foi investigada a progressão da criptococose causada por *Cryptococcus gattii* em modelo murino imunossuprimido por dexametasona, e tratado com fluconazol. Curva de sobrevivência e análise de comportamento nos animais, interação macrófago – levedura, susceptibilidade ao fluconazol e expressão de genes das colônias recuperadas dos animais foram avaliados. A partir dos resultados, foi constatado que o tratamento com fluconazol, independente da imunossupressão prolongou a sobrevivência dos camundongos, mas aumentou a morbidade da criptococose. Os animais imunossuprimidos apresentaram uma menor migração de leveduras para o cérebro, acompanhado de menor taxa de fagocitose dos macrófagos, e um maior índice de proliferação intracelular. Como conclusão, a imunossupressão em hospedeiro infectado com *Cryptococcus gattii* pode contribuir para uma menor migração da levedura para o SNC, porém a sobrevivência dos animais é reduzida.

#### 5.1 INTRODUÇÃO

A criptococose é uma infecção sistêmica que pode resultar no comprometimento pulmonar após inalação de propágulos do fungo *Cryptococcus* spp. (CHANDLER *et al.*, 1997). Frequentemente, a infecção se dissemina e pode atingir o SNC causando meningoencefalite (CASADEVALL; PERFECT, 1998). Criptococose causada por *C. neoformans* é bem descrita em hospedeiros imunocomprometidos e deficientemente estudada em paciente imunocompetentes (BOVERS *et al.*, 2008a). No entanto, *C. gattii* tem sido reportado como agente da criptococose em imunocompetentes, havendo também relatos em

hospedeiros imunossuprimidos (CHEN *et al*, 2012). Além disso, a infecção por *C. gattii* é reportada mais frequentemente em regiões tropicais e subtropicais e geralmente envolve pulmão e SNC (MITCHELL; PERFECT, 1995; SPEED; DUNT, 1995).

Dependendo do estado imunológico do paciente, os esporos podem permanecer dormentes no pulmão ou podem sofrer propagação hematogênica a quaisquer órgãos (CHANG *et al* 2006). Os pacientes com imunidade mediada por célula debilitada, tais como os infectados com o HIV, receptores de transplantes de órgãos sólidos, e aqueles em terapia corticosteróide crônica são mais vulneráveis à infecção pelo fungo (CHRISTIANSON *et al*, 2003).

O tratamento da criptococose ainda é limitado devido à escassez de drogas, toxicidade, baixa estabilidade, e resistência aos antifúngicos (LARSEN *et al.*, 2004). Assim como outros micro-organismos, os fungos podem ser naturalmente resistentes a determinadas drogas antifúngicas, consistindo em resistência primária, ou podem desenvolver resistência à droga durante exposição ao tratamento, consistindo na resistência secundária (PEREA; PATTERSON, 2002; SIONOV *et al*, 2013).

Dessa forma, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar a progressão da criptococose causada por *C. gattii* e o tratamento com fluconazol em modelo murino imunossuprimido por dexametasona.

## **5.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.2.1 Isolado de *Cryptococcus gattii*, teste de suscetibilidade ao fluconazol e curva de sobrevivência dos animais**

Neste estudo, foi utilizado o isolado de *C. gattii* L27-01 pertencente à coleção de micro-organismos do Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil. A concentração inibitória mínima (CIM) para o fluconazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) foi determinada pelo método de microdiluição (CLSI 2008) com adaptações (SANTOS *et al*, 2012). Os animais foram divididos em quatro grupos com esquemas de tratamento diferentes: imunossuprimido não infectado (Não infectado), não imunossuprimido infectado (C), imunossuprimido infectado não tratado (NTi), imunossuprimido infectado tratado com fluconazol (Fi). Os animais foram monitorados diariamente e foi construída uma curva de sobrevivência.

### **5.2.2 Imunossupressão dos camundongos e dose administrada do fluconazol**

Seis camundongos C57BL/6 fêmeas com 6 a 8 semanas de idade em cada grupo foram utilizadas em todos os experimentos. Os estudos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo 312/2012). Os camundongos foram abastecidos com alimento e água *ad libitum* num ambiente controlado com fotoperíodo de 12h claro/escuro. Para imunossupressão os animais, foi utilizado 0,5 mg/Kg de dexametasona diluído em água, e colocado em mamadeira esterilizada (MARQUES *et al* 2008). Os animais do grupo imunossuprimidos, receberam água com dexametasona *ad libitum* durante 20 dias. As gaiolas e mamadeiras foram trocadas por novas esterilizadas a cada três dias. Os camundongos infectados com *C. gattii* foram tratados com 10 mg/kg/dia de fluconazol.

### **5.2.3 Infecção intratraqueal, análise de comportamento animal, Unidades formadoras de colônias**

Os camundongos (n = 10 / grupo) foram anestesiadas por via intraperitoneal (i.p.) com cetamina (60 mg / kg) e xilazina (10 mg / kg) e foram posteriormente inoculados por via intratraqueal (IT) com 30 µL de uma suspensão do isolado L27/01 ( $1 \times 10^6$  UFC/animal) ou de PBS (controle não infectado). A análise comportamental foi realizada nos diferentes grupos para avaliar o curso da infecção segundo o protocolo SHIRPA (*SmithKline Beecham Pharmaceuticals*; Harwell MRC Mouse Genome Centre and Mammalian Genetics Unit Imperial College School of Medicine at St Mary's Royal London Hospital; St Bartholomew's; Royal London School of Medicine; Phenotype Assessment) (ROGERS *et al.*, 2001; HATCHER *et al.*, 2001). Os animais foram monitorados diariamente para análise comportamental, e quaisquer camundongos que pareciam moribundos (por exemplo, piloereção intensa, convulsões, falta de atividade locomotora) foram sacrificados sob anestesia por deslocamento cervical.

Os órgãos de animais de todos os grupos foram triturados e diluídos para recuperar as colônias fúngicas. Estas colônias foram utilizadas para determinação da carga fúngica nos órgãos, determinação da CIM para fluconazol e extração de RNA para análise molecular.

### **5.2.4 Interação de leveduras com macrófagos intraperitoneais de camundongos *in vitro***



Foram utilizados dois grupos para a interação de leveduras com macrófagos, um com animais imunocompetentes e outro com animais imunossuprimidos. Os macrófagos ( $1 \times 10^6$  células) intraperitoneais dos camundongos foram obtidos após injeção de três mililitros de caldo tioglicolato. Após três dias, foi realizado lavado peritoneal com PBS e cultivado em microplacas contendo meio RPMI, a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$  por oito horas, e os macrófagos dos animais imunossuprimidos permaneceram com 0,2 mg/mL de dexametasona na microplaca. Os macrófagos não aderidos foram lavados com PBS. Para infecção dos macrófagos com a levedura, foram adicionadas suspensões contendo *C. gattii* ( $1 \times 10^7$  UFC/ mL) que foram incubados a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$  durante 3 ou 27 horas, realizando-se triplicata dos experimentos para cada período. Para o acompanhamento da cinética da interação entre os macrófagos e *C. gattii*, a taxa de fagocitose foi determinada após 3 e 27 horas, e expressa em percentual, por meio da contagem de macrófagos que fagocitaram o fungo, em um total de 100 células. A contagem dos macrófagos foi realizada por meio de microscopia óptica.

O índice de proliferação intracelular foi realizado como descrito por Ma *et al* (2009). As leveduras não internalizadas foram retiradas do sobrenadante a partir dos poços, seguido de lavagem com 200 mL de PBS. Além disso, os macrófagos foram lisados com 200 mL de água destilada estéril e incubados durante 30 minutos, em seguida, foram recuperados e adicionados ao corante azul de trypan a uma razão de 1:1, para contagem das células viáveis da levedura. O índice de proliferação intracelular foi calculado pelo quociente entre o número de leveduras viáveis e intracelulares em 27 horas e o número de levedura intracelular inicial em 3 horas.

### **5.2.5 Avaliação da expressão dos genes de resistência e genes capsulares**

Para extração de RNA, foram utilizadas as colônias de *C. gattii* recuperadas dos animais, e também realizado o cultivo de *C. gattii* diretamente da coleção de microorganismos do Laboratório de Micologia em meio ágar-Sabouraud-dextrose (controle). A extração de RNA total foi realizada com o kit Rneasy (Qiagen®, Hilden, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante. Para a síntese de cDNA foi utilizado M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, Estados Unidos). Foi avaliada a expressão dos genes MDR1, AFR1, ERG11, UXS1, Cap59 e do gene normalizador  $\beta$ -actina, por meio de PCR em tempo real utilizando SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems®) para obtenção dos produtos de PCR, com a finalidade de avaliar os fatores de resistência ao fluconazol desenvolvidos por *C. gattii* durante a infecção.

### **5.2.6 Análise estatística dos dados**

*A análise estatística foi realizada com auxílio do software GraphPad Prism 5.0. Os resultados foram analisados estatisticamente quanto às diferenças significativas entre os grupos por meio da análise de variância (ANOVA) com os dados obtidos e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% e pelo teste T. O nível de significância de 95% foi considerado para que as medidas sejam significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). O Teste Log-Rank foi o método utilizado para comparação entre as curvas de sobrevivência, e o teste de correlação de Pearson foi utilizado para medir o grau da correlação e a direção dessa correlação (se positiva ou negativa) entre os genes utilizados nesse estudo.*

## **5.3 RESULTADOS**

### **5.3.1 Caracterização da criptococose causada por *C. gattii* em modelo murino imunossuprimido e avaliação da influência do fluconazol na progressão da doença**

Os animais não imunossuprimidos e infectados sobreviveram até o dia 24, enquanto que os animais imunossuprimidos e infectados sobreviveram até o dia 20. Porém quando o animal imunossuprimido é tratado com fluconazol, observa-se um aumento na sobrevivência em 11 %. (Figura 16).

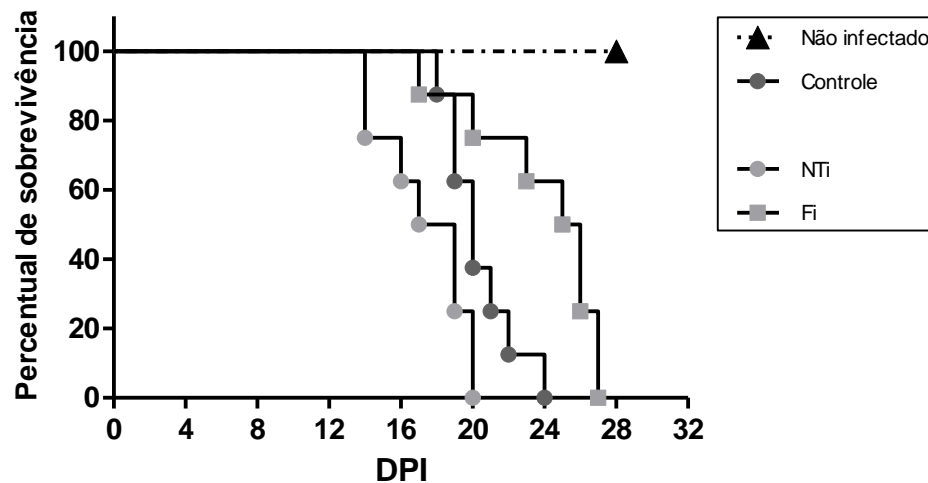


Figura 16: Representação gráfica das curvas de sobrevivência dos camundongos imunossuprimidos não infectados e após infecção com *C. gattii* pertencentes aos grupos não imunossuprimidos (Controle), imunossuprimidos não tratados (NTi), imunossuprimidos tratados com fluconazol (Fi), (n=10animais/grupo). Diferença estatisticamente significativa entre grupos de mesmo estado imunológico:  $\&= p<0.05$ ; Diferença estatisticamente significativa entre NT e NTi:  $\#= p<0.05$ .

### 5.3.2 Avaliação do comportamento

A fim de revelar possíveis alterações funcionais no curso da doença, o protocolo SHIRPA foi utilizado no ensaio de comportamento. Os resultados foram agrupados em cinco categorias funcionais (reflexos e função sensorial, estado neuropsiquiátrico, comportamento motor, função autônoma e tônus muscular; Figura 17 **a, b, c, d e e**, respectivamente), segundo Lackner *et al.* (2006).

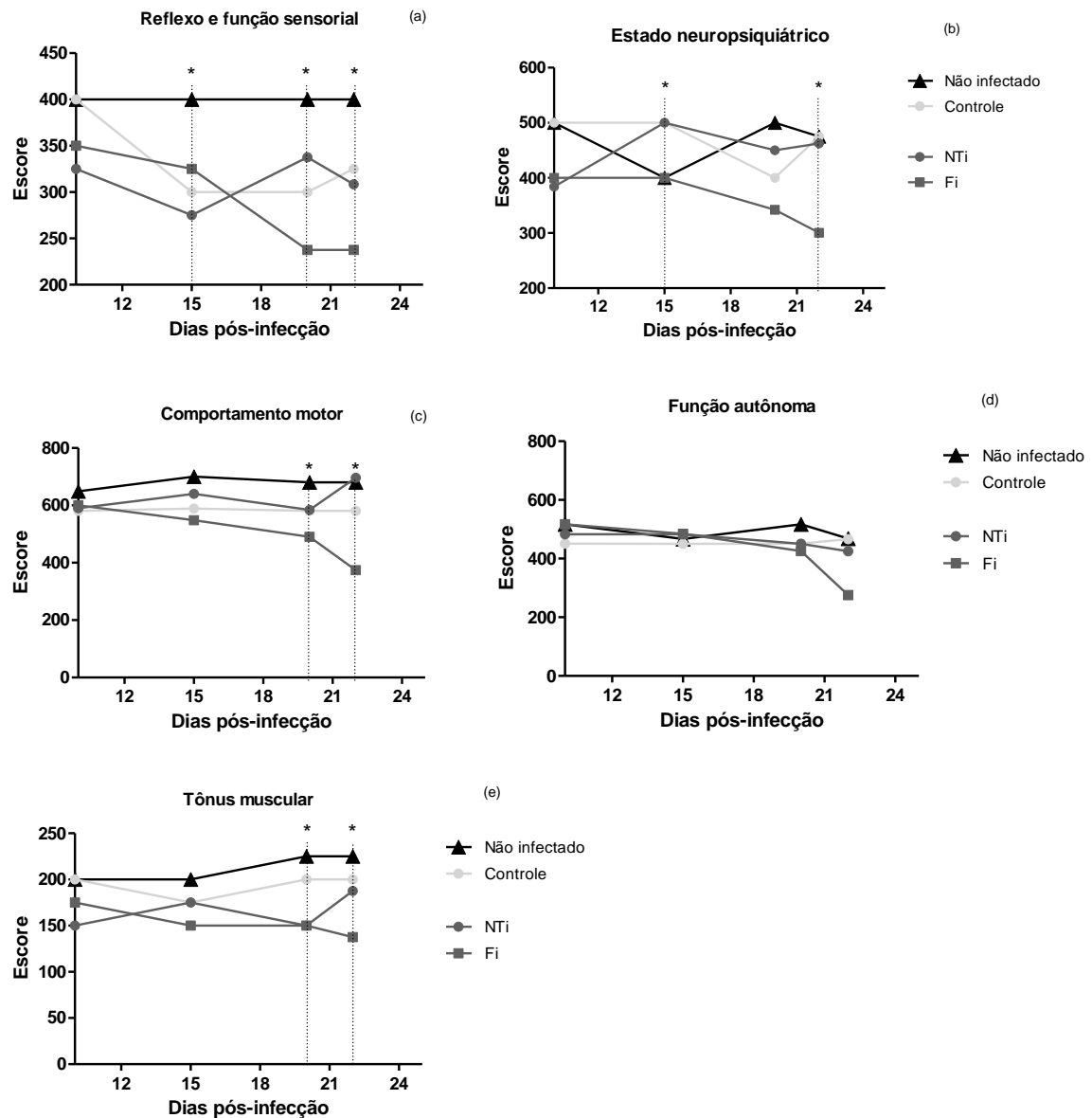


Figura 17: Curvas de desempenho no comportamento de animais não infectados e após infecção com *C. gattii* pertencentes aos grupos não imunossuprimidos (Controle), imunossuprimidos não tratados (NTi), imunossuprimidos tratados com fluconazol (Fi), em relação a cinco categorias funcionais distintas do protocolo SHIRPA. Reflexo e função sensorial (a), Estado neuropsiquiátrico (b), Comportamento motor (c), Função autônoma (d), Tônus muscular (e).  $n = 6$  camundongos/grupo. \*= Valor de  $p < 0,05$  considerado significativo em relação ao controle.

Os animais infectados desenvolveram uma gama de alterações comportamentais e funcionais no curso da criptococose, com uma deficiência significativa em quatro das cinco categorias funcionais avaliadas quando comparados ao grupo não infectado (Figura 17).

A avaliação das categorias foi realizada com a soma de cada parâmetro, por indivíduo, e o resultado foi dado pela pontuação geral por categoria. O escore dos grupos imunossuprimidos e infectados com *C. gattii* foi comparado aos dados dos animais não infectados e não imunossuprimido infectados (grupo controle), além disso, os animais imunossuprimidos infectados dos diferentes grupos foram comparados entre si.

As alterações significativas nos escores dos grupos começaram a ocorrer no 15º dia de infecção. As categorias que primeiro apresentaram diferença foram reflexo e função sensorial e estado neuropsiquiátrico. Diferenças estatisticamente significativa no comportamento motor e tônus muscular ocorreram no 20º dia para os animais imunossuprimidos infectados em comparação com os animais do grupo controle.

Nos parâmetros reflexo e função sensorial (Figura 17a) e estado neuropsiquiátrico (Figura 17b), a partir do 15º dia de infecção já houve alteração significativa para o grupo imunossuprimido infectado tratado com fluconazol (grupo Fi). Após 20 dias de infecção, os grupos não tratados permaneceram apresentando escores maiores que o grupo tratado, independente de imunossupressão.

O comportamento motor e tônus muscular foram alterados após o 20º dia, e os animais imunossuprimidos tratados com fluconazol (Fi) foram os que apresentaram escores mais baixos (Figura 17c e 17e), seguido dos animais imunossuprimidos não tratados (NTi). A função autônoma não foi alterada nos camundongos infectados (Figura 17d), houve apenas uma pequena alteração para o grupo Fi.

A imunossupressão não foi fator principal para a morbidade e mortalidade dos animais, visto que os animais que foram tratados apresentaram escores mais baixos para os parâmetros estudados, sendo possível que estas diferenças tenham sido provocadas devido à utilização do fluconazol.

### **5.3.3 Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em cérebro e pulmão**

A contagem de unidades formadoras de colônias por grama de tecido (UFC/g) nos diferentes grupos é mostrada na figura 18. Os animais imunossuprimidos apresentaram uma menor migração de leveduras para o cérebro comparado aos animais que não tiveram seu sistema imune alterado. Considerando que a principal forma de migração da levedura

para o SNC ocorre por meio de macrófagos infectados, efetuamos o ensaio de fagocitose e índice de proliferação intracelular utilizando células de animais imunocompetentes e imunossuprimidos para tentar explicar os resultados obtidos pela contagem de UFC/g de cérebro.

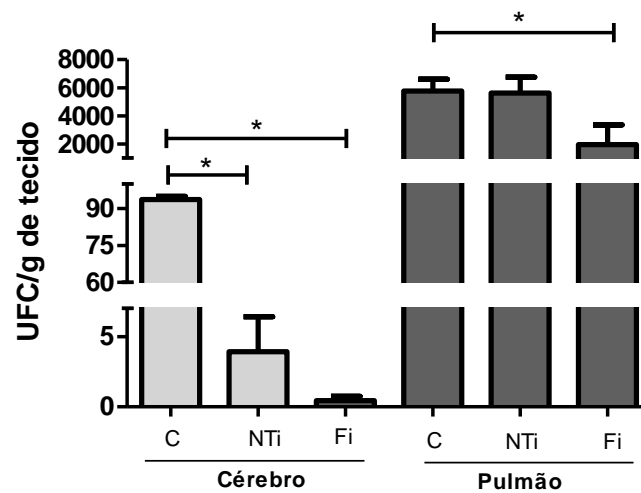


Figura 18: Unidades formadoras de colônias por gramas de tecido de animais infectados com  $1 \times 10^6$  células de *C. gattii* dos grupos não imunossuprimidos e infectados (C), imunossuprimidos não tratados (NTi), imunossuprimidos tratados com fluconazol (Fi). Diferença estatisticamente significativa entre diferentes \*=  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.0001$ .

#### 5.3.4 Interação de leveduras com macrófagos intraperitoneais de camundongos *in vitro*

A figura 19 representa a taxa de fagocitose realizada com macrófagos peritoneais de animais imunocompetentes e imunossuprimidos após 27 horas de infecção por *C. gattii*. O grupo não imunossuprimido apresentou aumento significativo da fagocitose (46%) em relação ao grupo imunossuprimido (24,5%) ( $p < 0,01$ ).

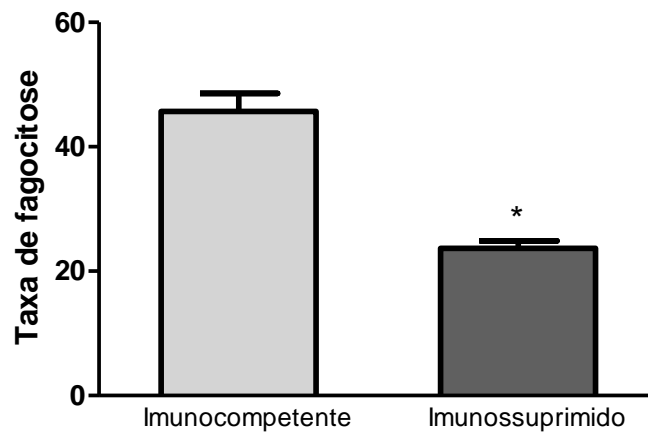


Figura 19: Taxa de fagocitose dos grupos infectados com *C. gattii* L27-01 a partir de macrófagos de animais não imunossuprimido e imunossuprimidos. Diferença estatisticamente significativa \*=  $p < 0.01$ .

O índice de proliferação intracelular entre os grupos imunocomprometidos e imunossuprimidos é apresentado na figura 20. O maior índice de proliferação foi observado nos macrófagos de animais imunossuprimidos, embora os macrófagos imunossuprimidos fagocitem menos.

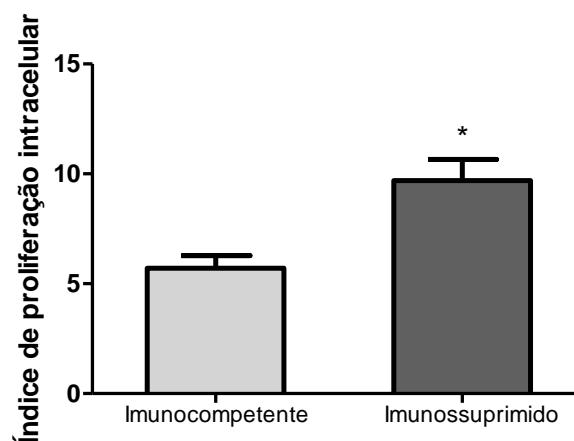


Figura 20: Índice de proliferação intracelular entre os grupos de animais não imunossuprimidos e imunossuprimidos infectados por *C. gattii*. \*=  $p < 0,05$ .

### 5.3.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A figura 21 apresenta a distribuição dos valores de CIM em  $\mu\text{g/mL}$ , por percentual de colônias de *C. gattii* recuperadas em cada tratamento recebido nos grupo dos animais.

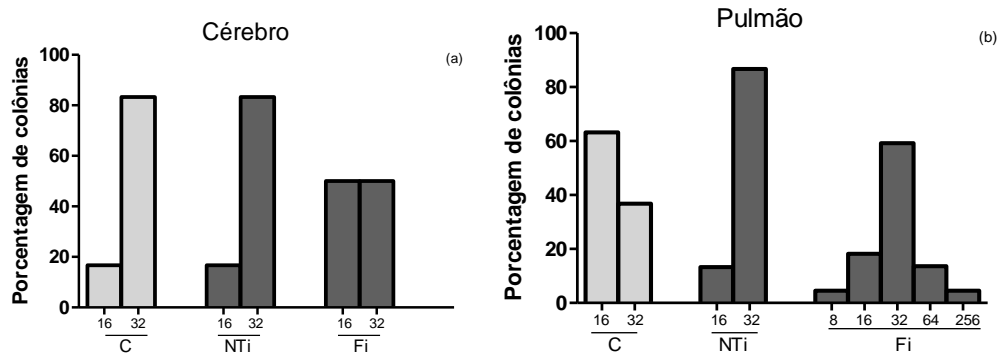


Figura 21: Percentual de colônias de *C. gattii* recuperadas dos cérebros (a) e pulmões (b) dos camundongos para cada valor de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ). C=grupo de animais infectados não imunossuprimidos, NTi=grupo de animais imunossuprimidos infectado não tratado e, Fi=grupo de animais imunossuprimidos infectado tratado com fluconazol.

No grupo de animais imunossuprimidos não tratados, as colônias recuperadas de cérebro e de pulmão apresentaram CIM entre 16 e 32  $\mu\text{g/mL}$ . As colônias provenientes do grupo Fi se mostraram mais resistentes à droga (CIM: 64 ou 256  $\mu\text{g/mL}$ ). Neste grupo, os valores de CIM para o fluconazol variou até 32 vezes (CIM: 8- 256  $\mu\text{g/mL}$ ).



### 5.3.6 Expressão dos genes CAP59, UXS1, MDR1, PDR1 e ERG11

Foram obtidos cDNAs das colônias recuperadas de *C. gattii*, sendo cinco colônias representativas de cada tratamento e órgão (C, NTi, Fi). As colônias armazenadas em ultrafreezer foram utilizadas para extração de RNA pelo kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguidos de RT-PCR para construção do cDNA.

Com esses cDNAs, foi realizado PCR em tempo real para os genes alvo relacionados a biossíntese da cápsula de *C. gattii* (CAP59 e UXS1), e aos genes envolvidos nos mecanismos de bombas de efluxo (MDR1 e PDR1), e síntese de ergosterol (ERG11), utilizando o isolado de *C. gattii* L27-01 sem contato com animal como calibrador das amostras.

A partir dos dados de Ct, a expressão dos genes foi normalizada com o gene constitutivo  $\beta$ -actina. Em seguida, os dados foram comparados com a colônia selvagem de referência (WT) que não entrou em contato com camundongo, e comparados ainda entre as colônias recuperadas dos cérebros e pulmões dos grupos infectados não imunossuprimidos (C). Os gráficos representativos dos dados de expressão dos genes envolvidos na biossíntese da cápsula são apresentados na figura 22 e dos genes associados a bombas de efluxo e síntese de ergosterol são apresentados na figura 23.

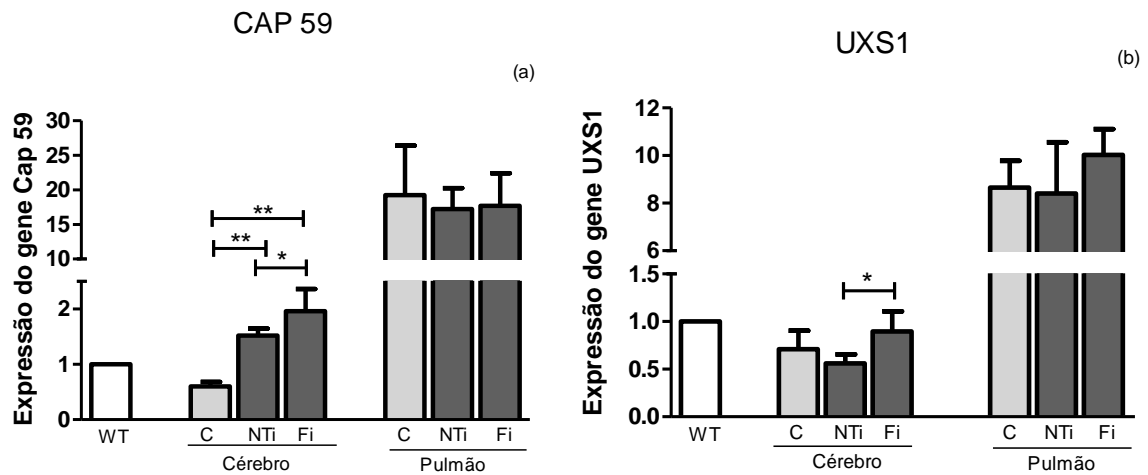


Figura 22: Expressão dos genes envolvidos na biossíntese da cápsula CAP59 (a) e UXS1 (b) de *C. gattii* nos grupos WT (selvagem), C (isolado recuperado de animal não imunossuprimido), NTi (isolado recuperado de animais imunossuprimido não tratado), Fi (isolado recuperado de animal imunossuprimido tratado). \*=  $p < 0.05$ .

As colônias recuperadas do cérebro dos animais imunossuprimidos infectados apresentaram aumento significativo na expressão do gene CAP59 em relação ao controle. O tratamento com fluconazol também promoveu aumento de 56% e 23% na expressão do gene Cap59 quando comparado ao grupo não tratado. Para o gene UXS1, as colônias Fi do cérebro apresentaram maior expressão que do grupo NTi.

Já as colônias recuperadas do pulmão, não apresentaram diferença estatística significativa, em ambos os genes.

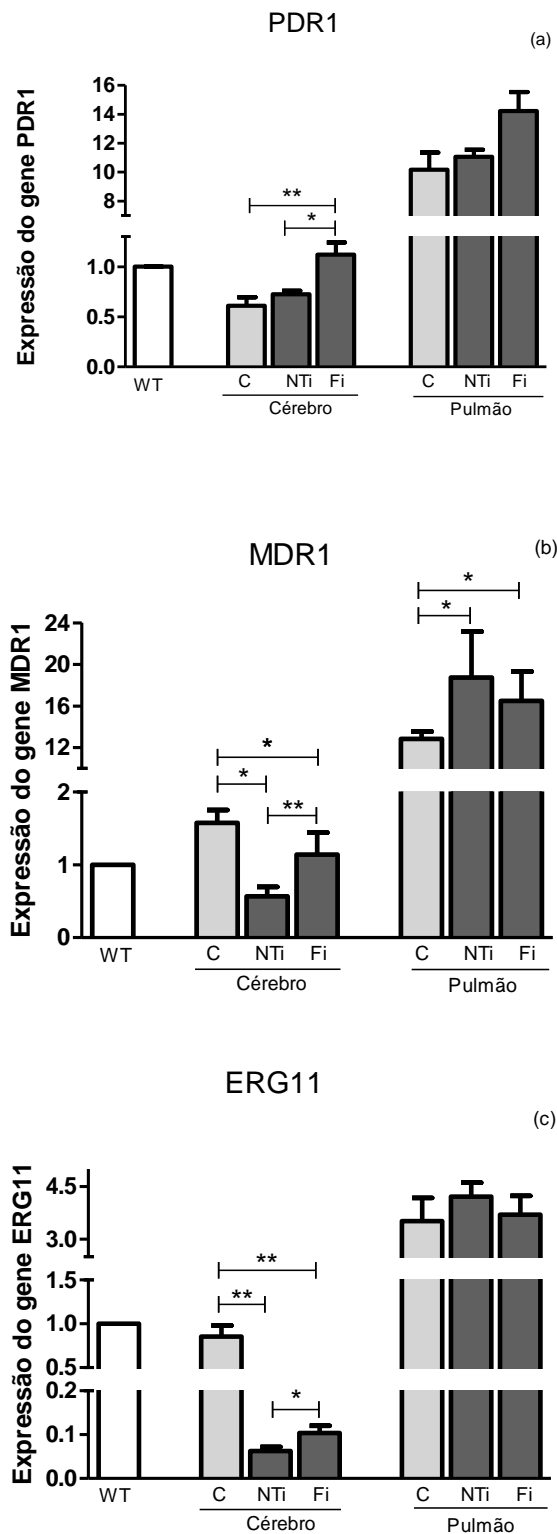


Figura 23: Expressão dos genes associados a bombas de efluxo PDR1 (a) e MDR1 (b) e síntese de ergosterol ERG11 (c) de *C. gattii* nos grupos WT (selvagem), C (isolado recuperado de animal não imunossuprimido), NTi (isolado recuperado de animais imunossuprimido não tratado), Fi (isolado recuperado de animal imunossuprimido tratado). \* =  $p < 0.05$ .

## 5.4 DISCUSSÃO

O primeiro relato, e de nosso conhecimento o único até o momento, sobre imunossupressão em animais infectados por *Cryptococcus gattii* abordou infecção experimental cutânea e da mucosa intestinal em camundongos, e avaliou apenas a sobrevivência dos animais e UFC dos tecidos epiteliais, hepático, cerebral e pulmonar (CAPILLA *et al*, 2006). Esse estudo examinou o efeito da imunodeficiência em murinos infectados por três espécies de *Cryptococcus*, incluindo *C. gattii*, e verificou que animais infectados com  $1 \times 10^6$  UFC de *C. gattii* foi recuperado apenas do fígado e pulmão, não sendo detectada infecção cerebral, tanto nos imunocompetentes quanto nos imunossuprimidos, não apresentando predileção por hospedeiros imunocompetentes (CAPILLA *et al*, 2006).

No presente estudo, a quantificação de UFC no pulmão não revelou diferença entre os grupos infectados controle e imunossuprimido não tratado, e sim diminuição nas colônias dos animais tratados. E assim como Capilla *et al* (2006), no cérebro houve uma drástica redução de UFC entre os animais imunossuprimidos, o que não ocorreu nos imunocompetentes, evidenciando que a imunossupressão dificulta a disseminação para o SNC. Interessantemente, Phillips *et al* (2009) observou que pacientes com meningite causada por *C. gattii* e portadores de anomalias no estado mental, e por isso são medicados com dexametasona, apresentaram uma redução no cérebro de cultura de *C. gattii* evidenciado por imagem. Corticosteróides não são recomendados para o tratamento de meningite criptocócica, porém concordamos com Phillips *et al* (2009) quando eles sugerem que o uso da dexametasona para esse subconjunto de pacientes possa ser avaliado. Além do mais, Seaton, *et al* (1997) relataram uma melhora na deterioração visual, sequela associada a criptococose, com o uso de corticosteroides, e afirmaram que estes imunossupressores podem ter um papel na prevenção ou estacionar a perda visual na meningite causada por *C. gattii* em pacientes imunocompetentes. Por outro lado, Beardsley *et al* (2016) em um ensaio clínico com pacientes portadores de HIV, verificou que a dexametasona não reduziu a mortalidade entre esses pacientes com meningite causada por *Cryptococcus* spp., e ainda foi associada a eventos adversos e menos capaz que o placebo. E após o tratamento antifúngico, o grupo de pacientes que receberam dexametasona apresentou maior número de UFC/mL da levedura no líquido cefalorraquidiano (LCR). Nosso estudo abordou o uso experimental da dexametasona, sem finalidade terapêutica, e foi observado redução de UFC no sistema nervoso central do grupo estudado.

Algumas estratégias de tratamento da criptococose para melhorar a função imunitária pode levar a Síndrome inflamatória de reconstituição imune (IRIS), um agravamento dos

sintomas atribuídos a danos nos tecidos devido a uma resposta imune exacerbada dirigida ao fungo. IRIS requer manejo terapêutico delicado implicando no controle da inflamação excessiva com corticosteroides. E nesses casos a neutralização de TNF- $\alpha$  pode ser eficiente (SITAPATI *et al.*, 2010; SCEMLA *et al.*, 2015). Por outro lado o bloqueio de TNF- $\alpha$  aumenta o risco da doença criptocócica (HORCAJADA *et al.*, 2007). Esses exemplos ilustram o paradigma de que é necessário um ponto delicado de regulação imune para controlar a criptococose (COELHO; CASADEVALL, 2016).

Glucuronoxilomanana (GXM) é o principal fator de virulência de *Cryptococcus* spp., possui efeitos imunossupressores incluindo a interferência com a fagocitose (CHAYAKULKEEREE; PERFECT, 2006), a inibição de respostas de células T (YAUCH *et al.*, 2006), e uma mudança para uma resposta imune TH2 com produção de citocinas (EINSIEDEL *et al.*, 2004). A terapia antifúngica pode resultar numa reversão da imunossupressão local induzida por GXM na infecção por *C. gattii* (EINSIEDEL *et al.*, 2004), e parece ser por isso que o grupo de camundongos imunossuprimidos e tratados apresentou uma maior sobrevivência que os animais controle apenas infectados.

Em nossos resultados, foram recuperadas colônias em todos os animais, porém, nos imunossuprimidos a quantidade de colônias achadas no cérebro foi significativamente menor que nos controles. Além disso, foi observada uma menor fagocitose das leveduras pelos macrófagos de animais imunossuprimidos, o que possivelmente levou a uma menor disseminação da levedura para o SNC, tendo em vista que um dos mecanismos de migração de *Cryptococcus* é pela hipótese da teoria do cavalo de troia (MA; MAY, 2009).

Apesar da menor infecção cerebral, a infecção pulmonar foi expressiva, refletindo na morbidade e há ainda ocorrência de resistência ao azol, visto que a CIM nos animais imunossuprimidos tratados aumentou para níveis superiores a 64  $\mu\text{g/mL}$ . Alguns pacientes infectados com *C. gattii* respondem lentamente ou de forma incompleta à terapia antifúngica (MITCHELL *et al.*, 1995), e podem apresentar respostas deficientes aos azóis (HARRIS *et al.*, 2011). Embora muitos fatores contribuam para as respostas desfavoráveis à terapia, estudos anteriores sugeriram que a resistência desempenha um papel significativo. Como exemplo, vários grupos reportaram CIM mais elevados de diversos antifúngicos para *C. gattii* do que para *C. neoformans* (GOMEZ-LOPEZ *et al.*, 2008; HARRIS *et al.*, 2011).

Nossos resultados apresentaram valores de CIM elevados de fluconazol para colônias recuperadas de animais que receberam o antifúngico. Esse fato comprova a possibilidade de desenvolvimento da resistência durante o tratamento. Pacientes de criptococose podem adquirir propágulos fúngicos derivados de mais de um isolado no ambiente, podendo haver

seleção dos isolados com resistência primária durante o tratamento (SOARES *et al*, 2008). Porém, em nosso estudo, os animais foram infectados com inóculo proveniente de apenas um isolado (CIM: 8-16  $\mu\text{g/ml}$ ), evidenciando que a resistência foi desenvolvida durante o tratamento, e que o fluconazol pode alterar a expressão de bombas de efluxo e síntese de ergosterol.

De acordo com Mendes *et al* (2010), um isolado de referência com CIM de 16  $\mu\text{g/mL}$  foi escolhido para avaliação *in vivo*, e após 14 dias de infecção, a colônia de *C. gatti* foi recuperada e o CIM obtido teve valor de 64  $\mu\text{g/mL}$ . Relatos anteriores também demonstraram essa variação de CIM durante a terapia com fluconazol. Um relato de caso no estado de Minas Gerais reportou um paciente que apresentou infecção cerebral causada por *C. gattii*, e o tratamento iniciado foi com anfotericina B, porém, sintomas de toxicidade renal levaram à substituição por fluconazol, e a infecção procedeu mesmo após o tratamento com FLC. A determinação do CIM para fluconazol do isolado clínico obteve valores acima de 64  $\mu\text{g/mL}$  (SOARES *et al*, 2008), evidenciado que o fenômeno que ocorre *in vitro*, como também em experimentos de modelos animais, pode ocorrer naturalmente nos pacientes tratados com a terapia antifúngica.

Nossos dados explanam aspectos importantes da interação patógeno-hospedeiro e destacam possíveis efeitos de terapias imunomoduladoras, fornecendo dados para novas propostas terapêuticas, que sejam individualizadas e de acordo com cada paciente.

## 6. CAPÍTULO 3

### Estudo do proteoma de *C gattii* recuperado de modelo murino

Alide Caroline Lima Fontes<sup>1</sup>, Jozi Estanislau<sup>2</sup>, Grace Santos Tavares<sup>3</sup>, Charley Christian Staats<sup>2</sup>, Marilene Henning Vainstein<sup>2</sup>, Jerônimo Conceição Ruiz<sup>3</sup>, Daniel Assis Santos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Biologia de fungos de importância médica e biotecnológica, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil

<sup>3</sup>Laboratório de Informática de Biosistemas, Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz Minas Gerais, Brasil

Este trabalho visa identificar, quantificar e caracterizar o conjunto de proteínas presentes em *Cryptococcus gattii*, antes e após a infecção em camundongo tratado e em camundongo não tratado. Para tanto foi realizada extração das proteínas totais dos grupos estudados, digestão triptica das mesmas, e análise em um espectrômetro de massas Q-ToF-micro. A análise computacional dos dados está em processamento no Centro de Pesquisas René Rachou (Fiocruz Minas), portanto os resultados apresentados serão preliminares. Dentre os grupos estudados, o isolado denominado WT da coleção de cultura foi o que apresentou menor número de proteínas, seguido do isolado FLC, e NT. Seis proteínas foram encontradas em todos os grupos, dentre elas Heat-shock protein 90 (HSP90) e Fator de alongação traducional 2 (eEF-2), que são proteínas bem conservadas e participam numa vasta gama de processos biológicos.

#### 6.1 INTRODUÇÃO

*Cryptococcus gattii* é um fungo patogênico, causador da doença sistêmica criptococose, que inicialmente se instala no pulmão, e frequentemente se dissemina para o SNC causando a meningite criptocócica (CHANDLER *et al.*, 1997). Esta infecção fúngica acomete principalmente indivíduos imunocompetentes (BOVERS *et al.*, 2008a), e apresenta uma elevada taxa de mortalidade devido à falta de um diagnóstico inicial correto, tratamento inadequado, e, possivelmente, a resistência emergente aos antifúngicos (BROWN *et al.*, 2012).

*C. gattii* tem fatores de virulência bem caracterizados que incluem cápsula polissacarídica, produção de melanina, fofolipases, crescimento a 37°C, e proteases extracelulares (DIXIT *et al.*, 2009). Esses fatores podem ser mais expressos em determinadas condições, contribuindo para um pior prognóstico da doença. Além disso, a levedura *Cryptococcus gattii* secreta várias proteínas que estão ligadas a sua interação com as células hospedeiras (SILVEIRA *et al* 2013).

O perfil de expressão das proteínas se altera em situações distintas em um mesmo organismo, constituindo-se um fluxo dinâmico que responde a estímulos internos e externos. As proteínas envolvidas nos processos biológicos são detectadas devido a alterações quantitativas, aparecimento ou desaparecimento, e modificações pós-traducionais (WESTERMEIER *et al*, 2002). Portanto, a aplicação da espectrometria de massa (MS) para peptídeos e análise de aminoácidos (em tandem MS / MS) permite a identificação de centenas de proteínas (SALVATO *et al*, 2010).

Nesse sentido, a proteômica visa caracterizar o conjunto de proteínas expressas pelo patógeno em um dado momento, como durante a infecção, e contribuir para a elucidação dos mecanismos regulatórios que ocorre na célula (WILKINS *et al*, 1996). A proteômica ainda permite caracterizar novos alvos para a ação de agente antifúngicos.

Visto que estudos anteriores (FONTES *et al*, 2016) demonstraram que os fatores de virulência podem ser alterados no curso da criptococose frente ao tratamento com fluconazol, o objetivo desse trabalho foi identificar e quantificar as proteínas totais que estão presentes em *C. gattii*, após a infecção em camundongo tratado e em camundongo não tratado.

## **6.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **6.2.1. Modelo murinho**

Foram utilizadas fêmeas C 57/6J, entre 6 a 8 semanas. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob Protocolo 312/2012.

A infecção pulmonar foi iniciada por via intratraqueal. Brevemente, foi realizada uma incisão no pescoço dos camundongos anestesiados, e introduzido inoculo de  $1 \times 10^6$  UFC de *C. gattii* L27/01 em 30µL de PBS.



Os camundongos foram mantidos em biotério com controle de luz e temperatura, recebendo água *ad libitum* e monitorados duas vezes ao dia. O grupo de animais que não recebeu tratamento algum após infecção foi denominado NT, enquanto que o grupo de animais que recebeu 10mg/kg/dia de fluconazol foi denominado FLC. Após 15 dias, os animais foram eutanasiados, seguindo recomendação do comitê de ética, e extraídos pulmão e cérebro para recuperar colônias fúngicas.

### **6.2.2. Isolado fúngico e meio de cultura**

Para este estudo foi utilizado o isolado *C. gattii* L27/01, sorotipo VGII, da coleção de cultura do Laboratório de Micologia da UFMG. Os experimentos seguintes foram realizados no Laboratório de fungos de importância médica e biotecnológica do Centro de Biotecnologia (Cbiot) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). As células foram mantidas em SDA por 48h a 37°C, lavadas em PBS esterilizado, coradas em azul de trypan a fim de quantificar  $1 \times 10^6$  células viáveis em câmara de Neubauer, para a infecção intratraqueal.

Após a extração dos órgãos do camundongo, pulmão e cérebro de cada animal foi triturado separadamente com 1 mL de PBS, e 50µL do macerado foi disposto em placa de Petri com SDA, para recuperar as colônias pós infecção e tratamento. As colônias provindas dos animais do grupo NT foram denominadas de L27/NT, e às que foram recuperadas do grupo de animais tratados foram denominadas L27/FLC.

### **6.2.3. Extração de proteínas totais de *Cryptococcus gattii***

Para preparo do inóculo, uma colônia única de *C. gattii* foi cultivada em meio YPD líquido, 37°C, por 48h, e centrifugada até obter o pellet das leveduras. Após, as células foram liofilizadas, trituradas com grau e pistilo em nitrogênio líquido. As células foram ressuspendidas em tampão de inibidores de proteases (Tris-HCl 50mM pH7,5; EDTA 1mM; Coquetel inibidor de proteases 10x SigmaFast Protease inhibitor cocktail tablets, EDTA-free; Iodoacetamida 5mM; CHAPS 2%), coletado o sobrenadante, onde as proteínas se encontram, e realizada quantificação pelo ensaio de Bradford (MARTINS *et al*, 2013; BRADFORD, 1976). A extração foi realizada com triplicatas biológicas para cada condição estudada (WT, L27/NT e L27/FLC).

#### 6.2.4. One-Dimensional Gel Electrophoresis

As proteínas (500µg) foram precipitadas com TCA 20% (ácido tricloroacético), adicionado acetona 100% gelada ao pellet formado após centrifugação, após retirar a acetona, adicionou-se tampão de amostra desnaturante (Tris-HCl 125mM pH 6,8; Glicerol 40%; SDS 4%; β-mercaptoetanol 400uM; Azul de bromofenol 0,02%), ferveu-se a mesma e foi aplicada ao gel de poliacrilamida. Para a eletroforese em gel de poliacrilamida, utilizou-se uma tensão de 100 volts por 2 horas. O gel foi então submergido em corante azul de Coomassie por 24 horas sob agitação constante. Posteriormente, o gel foi lavado três vezes, e mantido em ácido acético até o corte das bandas (spots) para digestão.

#### 6.2.5. Digestão dos extratos proteicos

Os *spots* das proteínas foram excisados do gel, e coletadas em microtubos. Uma parte do gel em branco foi cortada, utilizado como controle do gel e processado em paralelo as amostras. Os *spots* foram então desidratados em acetonitrila a fim de tirar os resíduos do corante azul de Coomassie. As proteínas foram reduzidas adicionando-se 10 mM de ditioneitol (DTT) em 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> até cobrir os spots. A solução de DTT foi substituída com mais ou menos o mesmo volume de 50 mM de iodoacetamida em NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> a 100 mM. Os *spots* foram lavados em 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> e desidratados em acetonitrila (3x). A fase líquida foi removida completamente, e os *spots* foram digeridos com tampão de tripsina (50mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> ; 12.5 ng/µL de tripsina (Sequencing Grade Modified Trypsin – Promega 100µg: 5x20µg). O sobrenadante foi removido, e substituído por 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, para manter os *spots* de gel úmidos durante a clivagem enzimática (37° C, 18hrs). Os peptídeos foram então extraídos com 20 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, liofilizados em centrifuga a vácuo (SpeedVac Thermo) e estocados a -20°C até utilização no Q-Tof. (SCHEVCHENKO *et al*, 1996).

#### 6.2.6. Espectrometria de massas

O material previamente liofilizado foi solubilizado em 15µL de ácido fórmico a 0,1%. A separação dos fragmentos gerados na hidrólise foi feita em um cromatógrafo líquido de ultra performance (UPLC) NanoAcquity (Waters). Os picos separados foram analisados por

espectrometria de massas em tandem (MS/MS) em um espectrômetro de massas Q-ToF-micro (Waters) e as coletas foram feitas no modo negativo na faixa de 400 a 2000 m/z. A voltagem do capilar e do cone de extração utilizadas foram 3500v e 40v, respectivamente. A análise realizada por LC-ESI-MS (cromatografia líquida acoplada a ionização por eletrôn-spray e espectrometria de massas) resultou no sequenciamento de peptídeos internos resultantes de hidrólise trípica de proteínas dos isolados de *C. gattii* L27, L27/NT e L27/FLC.

### 6.2.7. Análise computacional

Os picos iônicos dos arquivos gerados pelo Q-ToF-micro foram transformados em peptídeos pelo Mascot Matrix Science, utilizando o banco de dados de *C. gattii* WM 276 com modificação fixa para carbamidomethyl e variável para oxidação (metionina). Os peptídeos foram então analisados no programa FastX, para obtenção das proteínas identificadas. Essas análises estão em elaboração no Centro de Pesquisas René Rachou (Fiocruz Minas), sob a supervisão do Dr. Jeronimo Ruiz.

## 6.3 RESULTADOS PRELIMINARES

### 6.3.1 Quantificação das proteínas totais de *C. gattii*

A quantificação das proteínas extraídas foi realizada pelo método de Bradford, utilizando absorvância de 595nm no espectrofotômetro, e colocando o resultado seguinte equação:

$$\text{ABS} = \text{CP} \times [\text{mg/mL}]$$

Onde ABS é a absorvância; CP é o valor obtido da curva padrão; e [mg/mL] é o valor da quantificação da amostra em mg/mL. Os valores da quantificação são encontrados na Tabela 3.

Tabela 3: Quantificação das proteínas de *C. gattii* pelo método de Bradford

Amostra de <i>C. gattii</i>	Réplica biológica	Quantificação (mg/mL)	
		1ª Fração	2ª Fração
L27/01	1ª	2,55	1,22
	2ª	2,88	1,50
	3ª	3,26	2,13
L27/NT pulmão	1ª	3,45	2,67
	2ª	3,57	3,12
	3ª	3,76	3,05
L27/NT cérebro	1ª	3,72	3,14
	2ª	3,60	3,00
	3ª	4,00	3,23
L27/FLC pulmão	1ª	3,55	2,84
	2ª	3,62	3,05
	3ª	3,45	2,45
L27/FLC cérebro	1ª	3,86	2,95
	2ª	3,77	3,01
	3ª	3,75	3,26

### 6.3.2 Gel de eletroforese 1DE

Após a corrida eletroforética, as amostras apresentaram a maioria das bandas em tamanhos semelhantes, com diferentes intensidades. Os géis que tinham bandas evidentes foram utilizados para digestão trípica e posterior análise no espectrômetro de massas. Na figura 24, um exemplo do gel obtido e utilizado para a digestão trípica.

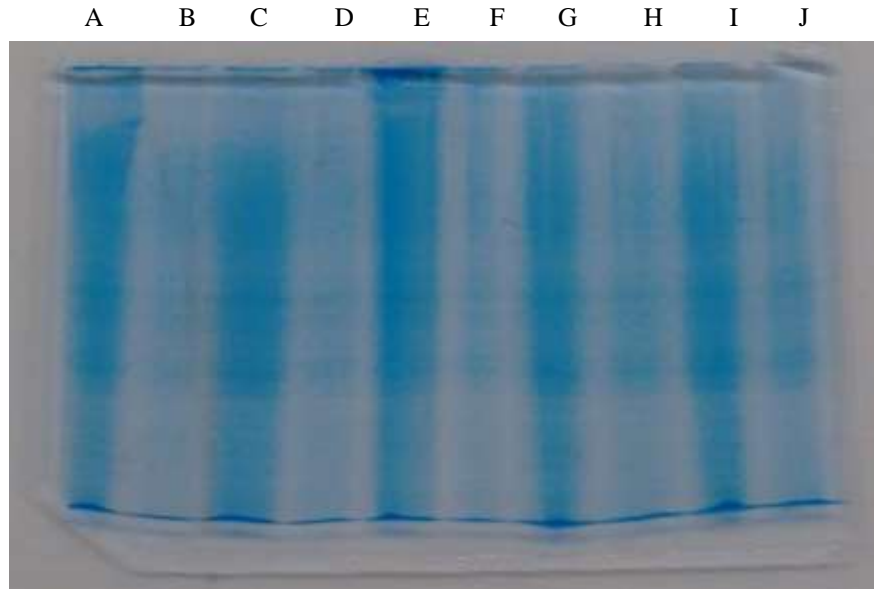


Figura 24: Gel SDS PAGE 1DE. Amostras de *C. gattii* L27/01 WT nas 1ª frações (A e C), nas 2ª frações (B, e D), e amostras de L27/NT nas 1ª frações (E, G e I) e nas 2ª frações (F, H e J).

### 6.3.3 Identificação dos peptídeos e proteínas

Após análise no espectrômetro de massas Q-Tof-micro, os peptídeos foram identificados utilizando o programa MASCOT versão 2.4.1, com os seguintes parâmetros:

Mascot: MS/MS Ions search

Data: swissprot

Fixed modification: oxidation (M) e carbamidomethyl

Peptide: 0,4

MS/MS: 0,6

Peptide change: 2+ and 3+

Data format: mascot genérico

ESI-QUAD-TOF

Foi desenvolvido um script em linguagem de programação PERL capaz de selecionar todos os peptídeos identificados pelo MASCOT. Este programa também dispõe estas informações em um arquivo com formato padronizado e que posteriormente foi utilizado como entrada para o programa FastX.

O programa FastX foi instalado de acordo com o manual do desenvolvedor, e o proteoma de referência utilizado para identificação das proteínas foi o *C. gattii* WM276. Foi desenvolvido um programa onde é realizada a seleção dos peptídeos mapeados de acordo com o melhor *hit*. Utilizando comandos em *shell* e um programa capaz de selecionar a sequência protéica em arquivos no formato fasta, foram selecionadas as proteínas identificadas pela espectrometria.

Na figura 25, tem-se a distribuição do total de proteínas encontradas para cada condição estudada: isolado da coleção de cultura L27/01, denominado de WT; isolado recuperado de animal não tratado denominado L27/NT; e isolado recuperado de animal tratado com fluconazol denominado L27/FLC.

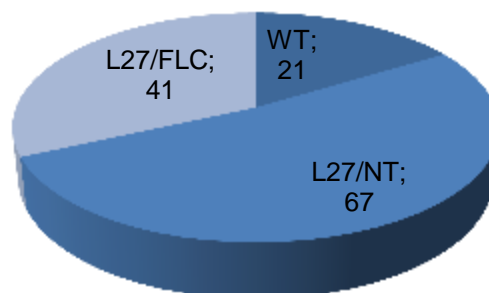


Figura 25: Distribuição de proteínas encontradas em cada condição do isolado de *Cryptococcus gattii*: WT= coleção de cultura; L27/NT=recuperado de camundongo não tratado; L27/FLC = recuperado de camundongo tratado com fluconazol.

#### 6.3.4 Frequência das proteínas nos grupos estudados

No grupo NT, quatro das proteínas encontradas tiveram frequência maior que 1. A proteína mais frequente (Cgwm2.036350) foi vista nos outros grupos. O mesmo ocorreu com os grupos L27/NT e L27/FLC (Tabela 4).

Tabela 4: Identificação das proteínas observadas em todas as condições, e sua frequência no proteoma

Identificação da proteína	Função da proteína	Frequência no proteoma		
		WT	L27/NT	L27/FLC
Cgwm2.000870	Hypothetical protein TREMEDRAFT_36779	1	8	2
Cgwm2.003830	Hypothetical protein TREMEDRAFT_37097	2	5	3
Cgwm2.036350	Hypothetical protein TREMEDRAFT_46109	10	16	19
Cgwm2.049260	Hypothetical protein A1Q2_07596	1	2	3
Cgwm2.062090	Translation elongation factor 2	4	14	16
Cgwm2.062330	Heat-shock protein 90	1	1	1

### 6.3.5 Proteínas identificadas nos grupos estudados

Do total de proteínas encontradas na espectrometria de massas, poucas foram compartilhadas entre os grupos, e podem ser visualizadas na Tabela 5. Heat-shock protein 90 (HSP90) e Fator de alongação traducional 2 (eEF-2) foram encontradas para todos os grupos e são proteínas bem conservadas que participam numa vasta gama de processos biológicos.

A relação de proteínas totais identificadas em cada grupo estudado encontra-se no ANEXO 2 deste trabalho.

Tabela 5: Proteínas partilhadas entre os grupos

Identificação da proteína	Função da proteína	Presença no grupo		
		WT	NT	FLC
Cgwm2.000870	hypothetical protein TREMEDRAFT_36779	+	+	+
Cgwm2.003830	hypothetical protein TREMEDRAFT_37097	+	+	+
Cgwm2.036350	hypothetical protein TREMEDRAFT_46109	+	+	+
Cgwm2.049260	hypothetical protein A1Q2_07596	+	+	+
Cgwm2.062090	translation elongation factor 2	+	+	+
Cgwm2.062330	heat-shock protein 90	+	+	+
Cgwm2.038660	ribosomal protein S14 40S	+	+	
Cgwm2.001830	hypothetical protein TREMEDRAFT_40960	+		+
Cgwm2.032500	hypothetical protein TREMEDRAFT_37881	+		+
Cgwm2.006070	hypothetical protein TREMEDRAFT_68507		+	+
Cgwm2.012950	peptidylprolyl isomerase		+	+
Cgwm2.013550	putative: CNB00610		+	+
Cgwm2.016780	hypothetical protein TREMEDRAFT_36956		+	+
Cgwm2.017010	hypothetical protein TREMEDRAFT_36956		+	+
Cgwm2.029720	hypothetical protein TREMEDRAFT_72720		+	+
Cgwm2.046030	hypothetical protein TREMEDRAFT_66620		+	+
Cgwm2.053320	hypothetical protein A1Q2_03404		+	+



## 7. CONCLUSÕES

1. A sub-dose de fluconazol altera os fatores de virulência do fungo, diminui a susceptibilidade ao fluconazol, altera a resposta inflamatória do hospedeiro e aumenta a morbidade de camundongos infectados com *C. gattii*;
2. O tratamento com fluconazol, mesmo em hospedeiro imunossuprimido, aumenta a sobrevivência do mesmo;
3. A imunossupressão provocou uma redução da migração para o SNC dos animais, provavelmente pela menor atividade fagocítica de macrófagos provenientes desses animais;
4. Há diferenças na expressão proteica do isolado em diferentes condições.
5. Os dados de proteômica podem auxiliar na identificação do papel biológico das proteínas hipotéticas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. M. F.; MATSUMOTO, M. T.; BAEZA, L. C.; SILVA, R. B. O.; KLEINER, A. A. P.; MELHEM, M. S.; GIANNINI, M. J. S. M. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical sequential isolates of *Cryptococcus neoformans* from São Paulo State, Brazil. *FEMS Yeast Research*, v. 7, p: 152–164. 2007.

ANZAI, M. C.; LAZÉRA, M. S.; WANKE, B.; TRILLES, L.; DUTRA, V.; de PAULA, D. A. J.; NAKAZATO, L.; TAKAHARA, D. T.; SIMI, W. B.; HAHN, R. C. *Cryptococcus gattii* VGII in a *Plathymenia reticulata* hollow in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. *Mycoses*, v. 57, p: 414–418. 2014.

BALTAZAR, L.M.; RIBEIRO, M.A. Primeiro isolamento de *Cryptococcus gattii* no Estado do Espírito Santo. *Rev Soc Bras Med Trop*. v. 41, n. 5, p. 449-53, 2008.

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

BARONI, F. A.; PAULA, C. R.; SILVA, E. G.; VIANI, F. C.; RIVERA, I. N.; OLIVEIRA, M. T. B.; GAMBALE, W. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro City, RJ, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, v. 48, n. 2, p. 71-75, 2006.

BAR-PELED, M.; GRIFFITH, C. L.; DOERING, T. L. Functional cloning and characterization of a UDP-glucuronic acid decarboxylase: the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* elucidates UDP-xylose synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 98, p:12003–12008. 2001.

BAUMANN, K.; ADELANTADO, N.; LANG, C.; MATTANOVICH, D.; FERRER, P. Protein trafficking, ergosterol biosynthesis and membrane physics impact recombinant protein secretion in *Pichia pastoris*. *Microb. Cell Fact.* 2011.

BEARDSLEY, J.; WOLBERS, M.; KIBENGO, F.M.; GGAYI, A.B.M.; KAMALI, A.; CUC, N.T.K.; BINH, T.Q.; CHAU, N.V.V.; FARRAR, J.; MERSON, L.; PHUONG, L.; THWAITES, G.; VAN KINH, N.; THUY, P.T.; CHIERAKUL, W.; SIRIBOON, S.;

THIANSUKHON, E.; ONSANIT, S.; et al. Adjunctive Dexamethasone in HIV-Associated Cryptococcal Meningitis. *New England Journal of Medicine*. V 374, p: 542-554, 2016.

BENNETT, J. E. Agentes antifúngicos. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G.; BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. As bases farmacológicas da terapêutica. 11. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill, cap. 48, p. 1103-1118, 2003.

BETTELLI, E.; CARRIER, Y.; GAO, W.; KORN, T.; STROM, T. B.; OUKKA, M.; WEINER, H. L.; KUCHROO, V. K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, v. 441, p: 235-238. 2006.

BENHAM, R. W. Cryptococci: Their identification by morphology and serology. *J Infect Dis*, v. 57, p. 255-274, 1935.

BICANIC, T.; HARRISON, T.S. Cryptococcal meningitis. *British Medical Bulletin*, v. 72, n 1, p: 99–118, 2004.

BIONDO, C.; MIDIRI, A.; GAMBUZZA, M.; GERACE, E.; FALDUTO, M.; GALBO, R.; BELLANTONI, A.; BENINATI, C.; TETI, G.; LEANDERSON, T.; MANCUSO, G. IFN- $\alpha/\beta$  signaling is required for polarization of cytokine responses toward a protective type 1 pattern during experimental cryptococcosis. *J. Immunol.* v. 181, p:566–573, 2008.

BIONDO, C., SIGNORINO, G., COSTA, A., MIDIRI, A., GERACE, E., GALBO, R.; MANCUSO, G. Recognition of yeast nucleic acids triggers a host-protective type I interferon response. *European journal of immunology*, v. 41, n. 7, p. 1969-1979, 2011.

BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. Clinica de pequenos animais, Manual Saunders, editora Roca, p.1406-08, 1998.

BONJARDIM, C.A.; FERREIRA, P.C.P; KROON, E.G. Interferons: signaling, antiviral and viral evasion. *Immunology letters*, v. 122, n. 1, p. 1-11, 2009.

BOSE, I.; REESE, A.J.; ORY, J.J.; JANBON, G.; DOERING, T.L.A. Yeast under Cover: the Capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic cell*. v.2, n 4, p: 655-663, 2003.

BOVERS, M.; HAGEN, F.; BOEKHOUT, T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex. *Rev. iberoamer. Micol.*, v. 25, p. S4-S12, 2008a.

BOVERS, M.; HAGEN, F.; KURAMAE, E. E.; BOEKHOUT, T. Six monophyletic lineages identified within *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by multi-locus sequence typing. *Fungal Genet. Biol.*, v. 45, p. 400–421, 2008b.

BRAJTBURG, J.; POWDERLY, W. G.; KOBAYASHI, G. S.; MEDOFF, G. Amphotericin B: Current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 183–188, 1990.

BUENTKE, E.; SCHEYNIUS, A. Dendritic cells and fungi. *Acta, Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, v. 111, p. 789-796, 2003.

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. *Medical Mycology*. v.44, n.7, p:601-610, 2006.

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

CASTLE, S.A.; OWUOR, E.A.; THOMPSON, S.H.; GARNSEY, M.R.; KLUTTS, J.S.; DOERING, T.L.; LEVERY, S.B. Beta 1,2-xylosyltransferase Cxt1p is solely responsible for xylose incorporation into *Cryptococcus neoformans* glycosphingolipids. *Eukaryot. Cell* v. 7, n.9, p: 1611–1615. 2008.

CHANDLER, F.W.; WATTS, J.C. Cryptococcosis. In: CONNOR, D.H.; CHANDLER, F.W.; SCHWARTZ, D.A. et al., ed. Pathology of infectious diseases. Stamford, Appleton & Lange, p. 989-997, 1997.

CHANG, W.; TZAO, C.; HSU, H.; LEE, S.C.; HUANG, K.L.; TUNG, H.J.; CHEN, C.Y. Pulmonary Cryptococcosis: Comparison Of Clinical And Radiographic Characteristics In Immunocompetent And Immunocompromised Patients. *Chest* v.129, n 2, p:333-340, 2006.

CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S. *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen. *Trends in microbiology*. v. 19, n. 11, p: 564-571. 2011.

CHATURVEDI, V.; WONG, B.; NEWMAN, S.L. Oxidative killing of *Cryptococcus neoformans* by human neutrophils: evidence that fungal mannitol protects by scavenging reactive oxygen intermediates. *The Journal of Immunology*, v. 156, n 10, p: 3836–3840, 1996.

CHAWLA-SARKAR, M.; LINDNER, D.J.; LIU, Y.F., WILLIAMS, B.R.; SEN, G.C.; SILVERMAN, R.H.; BORDEN, E.C. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis*, v. 8, n. 3, p. 237-249, 2003.

CHAYAKULKEEREE, M.; PERFECT, J. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am* v20, p:507–44, 2006.

CHEN, S.C.A.; SLAVIN, M.A.; HEATH, C.H.; PLAYFORD, E.G.; BYTH, K.; MARRIOTT, D.; KIDD, S.E.; BAK, N.; CURRIE, B.; HAJKOWICZ, K.; KORMAN, TM.; MCBRIDE, W.J.H.; MEYER, W.; MURRAY, R.; SORRELL, T.C. Clinical Manifestations of *Cryptococcus gattii* Infection: Determinants of Neurological Sequelae and Death. *Clin Infect Dis*.v. 55, n 6, p: 789-798, 2012.

CHEN, L.C.; BLANK, E. S.; CASADEVALL, A. Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 3, n 5, p: 570–574, 1996.

CHEN, S.; SORRELL, T.; NIMMO, G.; SPEED, B.; CURRIE, B.; ELLIS, D.; MARRIOTT, D.; PFEIFFER, T.; PARR, D.; BYTH, K. Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group. *Clin Infect Dis.*, v. 31, n. 2, p. 499-508, 2000.

CHEN, S.C.A.; WRIGHT, L.C.; GOLDING, J.C.; SORRELL, T.C. Purification and characterization of secretory phospholipase B, lysophospholipase and

lysophospholipase/transacylase from a virulent strain of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Biochemical Journal*, v.347, n 2, p: 431–439, 2000.

CHRISTIANSON, J.C.; ENGBER, W.; ANDES, D. Primary cutaneous cryptococcosis in immunocompetent and immunocompromised hosts. *Medical Mycology*, v. 41, n 3, p. 177–188, 2003.

CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A. Comparison of fungizone, Amphotec, AmBisome, and Abelcet for treatment of systemic murine cryptococcosis. *Antimicrob. Agents. Chemother.* v. 42, n. 4, p. 899-902, 1998.

COELHO, C.; CASADEVALL, A. Cryptococcal therapies and drug targets: the old, the new and the promising. *Cellular Microbiology*.V.18, n 6,p: 792–799, 2016.

COLLINS, H. L.; BANCROFT, G. J. Encapsulation of *Cryptococcus neoformans* impairs antigen-specific T-cell responses. *Infection and Immunity*, v.59, n 11, p: 3883–3888, 1991.

COUTINHO, R.; ZAREHDINNE, M.; PEIXOTO, A.; JUNIOR, J.; PEDROSO, E.. Infecção abdominal por *Cryptococcus* sp em paciente com imunodeficiência adquirida em uso de profilaxia secundária com fluconazol. *Rev Med Minas Gerais*, v. 21, n. 4, p.467-470, 2012.

COX, G.M.; HARRISON, T. S.; MCDADE, H. C.; TABORDA, C. P.; HEINRICH, G.; CASADEVALL, A.; PERFECT, JR. Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. *Infect. Immun*, v. 71, p: 173–180. 2003.

D'SOUZA, C.A., KRONSTAD, J.W., TAYLOR, G., WARREN, R., YUEN, M., HU, G.; CUOMO, C.A.Genome variation in *Cryptococcus gattii*, an emerging pathogen of immunocompetent hosts. *MBio*, v. 2, n. 1, p. e00342-10, 2011.

DEBENEDICTIS, C.; JOUBEH, S.; ZHANG, G.; BARRIA, M.; GHOHESTANI, R. F. Immune functions of the skin. *Clin Dermatol*. v. 19, p. 573-85, 2001.

DE BEDOUT, C.; ORDÓÑEZ, N.; GÓMEZ, B.; L.; RODRIGUES, M.; C.; ARANGO, M.; RESTREPO, A.; CASTANEDA, E. In vitro antifungal susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and *neoformans* var. *gattii*. *Rev. Iberoan. Micol.* v.16, p. 36-39, 1999.

DEL POETA, M. Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell*, v. 3, n. 5, p. 1067-1075, 2004.

DERESINSKI, S. C.; LILLY, R. B.; LEVINE, H. B.; GALGANI, J. N.; STEVENS, D.A. Treatment of fungal meningitis with miconazole. *Arch. Intern. Med.*, v. 137, n. 9, p.1180-1185, 1977.

DIAMOND, R. D.; ROOT, R. K.; BENNETT, J. E. Factors influencing killing of *Cryptococcus neoformans* by human leukocytes in vitro. *J. Infect. Dis.*, v. 125, n. 4, p. 367-376, 1972.

DIAMOND, D. M.; BAUER, M.; DANIEL, B. E.; LEAL, M. A. E.; JHONSON, D.; WILLIAMS, B. K.; THOMAS, A. M.; DING, J. C.; NAJVAR, L.; GRAYBILL, J. R.; LARSEN, R. A. Amphotericin B Colloidal Dispersion Combined with Flucytosine with or without Fluconazole for Treatment of Murine Cryptococcal Meningitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, USA, v. 42, n. 3, p. 528–533, 1998.

DIAS-JUNIOR, C. A.; CAU, S. B. A.; TANUS-SANTOS, J. E. Papel do óxido nítrico na regulação da circulação pulmonar: implicações fisiológicas, fisiopatológicas e terapêuticas. *J. bras. pneumol.*, v. 34, n. 6, 2008.

DIXIT, A.; CARROLL, S. F.; QURESHI, S. T. *Cryptococcus gattii*: an emerging cause of fungal disease in North America. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, p. 1-13, 2009.

DONG, Z.M.; JACKSON, L.; MURPHY, J. W. Mechanisms for induction of L-selectin loss from T lymphocytes by a cryptococcal polysaccharide, glucuronoxylomannan. *Infection and Immunity*, v. 67, n 1, p: 220–229, 1999.

DONG, Z. M.; MURPHY, J. W. Effects of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* cells and culture filtrate antigens on neutrophil locomotion. *Infect. Immun.*, v. 63, n. 7, p. 2632-2644, 1995.

DUNKEL, N.; LIU, T. T.; BARKER, K. S.; HOMAYOUNI, R.; ORSCHHAUSER, J.; ROGERS, P. D. A Gain-of-function mutation in the transcription factor UPC2P causes upregulation of ergosterol biosynthesis genes and increased fluconazole resistance in a clinical *Candida albicans* isolate. *Eukaryot Cell*, Germany, v. 7, n. 7, p. 1180–1190, 2008.

EINSIEDEL, L.; GORDON, D.L.; DYER, J.R. Paradoxical inflammatory reaction during treatment of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* meningitis in an HIV-seronegative woman. *Clin Infect Dis* v 39, p:e78–82, 2004.

ELLERBROEK, P.M.; WALENKAMP, A.M.E.; HOEPELMAN, A.I.M.; COENJAERTS, F.E.J. Effects of the capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans* on phagocyte migration and inflammatory mediators. *Current Medicinal Chemistry*, v.11, n.2, p:253–266, 2004.

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

ELLIS, D.; MARRIOTT, D.; HAJJEH, R. A.; WARNOCK, D.; MEYER, W.; BARTON, R. Epidemiology: surveillance of fungal infections. *Medical Mycology*, v. 38, supplement 1, p. 173–182, 2000.

EVANS, E. E. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. I. A serologic classification by means of the capsular and agglutination reactions. *J Immunol*, v. 64, p. 423-430, 1950.

FALAGAS, M. E.; MAKRIS, G. C.; DIMOPOULOS, G.; MATTHAIYOU, D. K. Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance? *Clin Microbiol Infect*, v.14, p.101-4, 2008.



FAVALESSA, O. C.; RIBEIRO, L. C.; TADANO, T.; FONTES, C. J. F.; DIAS, F. B.; COELHO, B. P.; ALBUQUERQUE, H. R. C. Primeira descrição da caracterização fenotípica e susceptibilidade in vitro a drogas de leveduras do gênero *Cryptococcus* spp isoladas de pacientes HIV positivos e negativos, Estado de Mato Grosso. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, v. 42, n. 6, 2009.

FELDMESSER, M.; KRESS, Y.; CASADEVALL, A. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. *Microbiology*.v. 147, n. 8, p. 2355-2365, 2001.

FELL JW, BOEKHOUT T, FONSECA A, SCORZETTI G, STATZELL-TALLMAN A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* v. 50, n 3, p:1351–1371, 2000.

FERREIRA, G. F.; BALTAZAR, L. M.; SANTOS, J. R.; MONTEIRO, A. S.; FRAGA, L. A.; RESENDE-STOIANOFF, M. A.; SANTOS, D. A. The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. *J Antimicrob Chemother*,v. 68, n. 8, p: 1801-11, 2013.

FERREIRA, G.F.; SANTOS, JRA.; COSTA, M.C.; HOLANDA, R.A.; DENADAI, A.M.L.; FREITAS, G.J.C.; SANTOS, A.R.C.; TAVARES, P.B.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, D.A. Heteroresistance to Itraconazole Alters the Morphology and Increases the Virulence of *Cryptococcus gattii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 59, n 8, p: 4600-4609, 2015.

FICA, A. C. Treatment of systemic fungal infections. I. Fluconazole, itraconazole, and voriconazole. *Rev. Chilena Infectol.*, v. 21, p. 26 –38, 2004.

FONSECA, F. L.; NOHARA, L. L.; CORDERO, R. J.; FRASES, S.; CASADEVALL, A.; ALMEIDA, I. C.; NIMRICHTER L.; RODRIGUES, M. L. Immunomodulatory effects of serotype B glucuronoxylomannan from *Cryptococcus gattii* correlate with polysaccharide diameter. *Infection and immunity*, v.78, n.9, p:3861-3870,2010.

FÖRSTERMANN, U.; BOISSEL, J. P.; KLEINERT, H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J.* v. 12, n. 10, p. 773-790, 1998.

FREIRE, A. K. L., Dos SANTOS BENTES, A., DE LIMA SAMPAIO, I., MATSUURA, A. B. J., OGUSKU, M. M., SALEM, J. I., WANKE, B.; DE SOUZA, J. V. B. Molecular characterisation of the causative agents of cryptococcosis in patients of a tertiary healthcare facility in the state of Amazonas-Brazil. *Mycoses*, v. 55, p. 145–150, 2012.

FRESNO, C.; SOULAT, D.; ROTH, S.; BLAZEK, K.; UDALOVA.; I, SANCHO, D.; RULAND, J.; ARDAVÍN, C. Interferon- $\beta$  Production via Dectin-1-Syk-IRF5 signaling in dendritic cells is crucial for immunity to *C. albicans*. *Immunity*.v. 38, n.6, p:1176-86, 2013.

GAST, C. E.; BASSO, L. R.; BRUZUAL, I.; WONG, B. Azole Resistance in *Cryptococcus gattii* from the Pacific Northwest: Investigation of the Role of ERG11. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 57, n. 11, p. 5478-5485, 2013.

GATTI, F.; EECKLES, R. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894. I. Description of the disease and of the strain. *Ann Soc Belg Med Trop*, v.50, p: 689-693, 1970.

GOLDMAN, D.; SONG, X.; KITAI, R.; CASADEVALL, A.; ZHAO, M. L.; LEE, S. C. *Cryptococcus neoformans* induces macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP- 1alpha) and MIP-1beta in human microglia: role of specific antibody and soluble capsular polysaccharide. *Infect. Immun.*,v. 69, n. 3, p. 1808-1815, 2001.

GOMEZ-LOPEZ, A.; ZARAGOZA, O.; ANJOS MARTINS, M.; MELHEM, M. C.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M. In vitro susceptibility of *Cryptococcus gattii* clinical isolates. *Clin Microbiol Infect*, v. 14, p. 727-30, 2008.

GOUJON, C.; MONCORGÉ, O.; BAUBY, H.; DOYLE, T.; WARD, C. C.; SCHALLER, T.; HUÉ, S.; BARCLAY, W. S.; SCHULZ, R.; MALIM, M. H. Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection. *Nature*, v. 502, n. 24, p: 563-559. 2013.

GOVENDER, N. P.; PATEL, J.; VAN WYK, M.; CHILLER, T. M.; LOCKHART, S. R. Trends in antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates obtained through population-based surveillance in South Africa in 2002-2003 and 2007-2008. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 55, n. 6, p. 2606-2611, 2011.

GROLL, A. H.; KOLVE, H. Antifungal agents: in vitro susceptibility testing, pharmacodynamics, and prospects for combination therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 23, p. 256-270, 2004.

HAGAN, J.E.; DIAS, J.S.; VILLASBOAS-BISNETO, J.C.; FALCÃO, M.B.; KO, A.I.; RIBEIRO, G.S. Puerperal brain cryptococcoma in an HIV-negative woman successfully treated with fluconazole: a case report. *Rev.Soc.Bras.Med Trop*, v. 47, n. 2, p: 254-256. 2014.

HAGEN, F.; CERESINI, P. C.; POLACHEK, I.; MA, H.; NIEUWERBURGH, F. V. Ancient Dispersal of the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus gattii* from the Amazon Rainforest. *PLoS ONE*, v. 8, n. 8, p: 711-48. 2013.

HANSONG, M. A.; ROBIN, C. M. Virulence in *Cryptococcus* species. *Adv Appl Microbiol*, v. 67, p. 131-190, 2009.

HARRIS, J.R.; LOCKHART, S.R.; DEBESS, E.; MARSDEN-HAUG, N.; GOLDOFT, M.; WOHRLE, R.; CHILLER, T. *Cryptococcus gattii* in the United States: clinical aspects of infection with an emerging pathogen. *Clinical infectious diseases*, v.53, n.12, p:1188-1195, 2011.

HARRIS, J.R.; GALANIS, E.; LOCKHART, S.R. *Cryptococcus gattii* Infections and Virulence. *Current Fungal Infection Reports*. v. 8, n.1, p:81-89, 2014.

HATCHER, J.P.; JONES, D.N.; ROGERS, D.C.; HATCHER, P.D.; REAVILL, C.; HAGAN, J.J.; HUNTER, A.J. Development of SHIRPA to characterize the phenotype of gene-targeted mice. *Behav Brain Res* v. 125, p: 43-47, 2001.

HAZEN, E.; BROWN, R. Two antifungal agents produced by a soil actinomyces. *Science*, v.112, p.423,1950.

HEITMAN, J.; ALLEN, B.; ALSPAUGH, J. A.; KWON-CHUNG, K. J. On the origins of congenic MAT $\alpha$  and MAT $\alpha$  strains of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Fungal.Genet.Biol.*, v. 28, n. 1, p. 1-5, 1999.

HOLMES, A. R.; KENIYA, M. V.; IVNITSKI-STEELE, I.; Monk, B. C.; LAMPING, E.; SKLAR, L. A.; CANNON, R. D. The Monoamine Oxidase A Inhibitor Clorgyline Is a Broad-Spectrum Inhibitor of Fungal ABC and MFS Transporter Efflux Pump Activities Which Reverses the Azole Resistance of *Candida albicans* and *Candida glabrata* Clinical Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 56, n. 3, p: 1508-1515, 2012.

HORCAJADA, J.P.; PEÑA, J.L.; MARTÍNEZ-TABOADA, V.M.; PINA, T.; BELAUSTEGUI, I.; CANO, M.E., et al. Invasive Cryptococcosis and adalimumab treatment. *Emerging Infect Dis* v 13, p: 953–955, 2007.

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*, v. 40, p. 565-71, 2002.

HUANG, C.; LEVITZ, S. M. Stimulation of macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ , macrophage inflammatory protein-1 $\beta$ , and RANTES by *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* in peripheral blood mononuclear cells from persons with and without human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.*, v. 181, n. 2, p. 791- 794, 2000.

JACOBSON, E. S.; PAYNE, W. R. UDP glucuronate decarboxylase and synthesis of capsular polysaccharide in *Cryptococcus neoformans*. *J. Bacteriol*, v. 152, p: 932–934. 1982.

JACOBSON, E.S.; EMERY, H.S. Catecholamine uptake, melanization, and oxygen toxicity in *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Bacteriology*, v. 173, n 1, p: 401–403, 1991.

[JAIN](#), N.; [LI](#), L.; [MCFADDEN](#), D. C.; [BANARJEE](#), U.; [WANG](#), X.; [COOK](#), E.; [FRIES](#), B. C. Phenotypic switching in a *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* strain is associated with

changes in virulence and promotes dissemination to the central nervous system. *Infection and Immunity*, v. 74, n. 2, p. 896–903, 2006.

JANBON, G. *Cryptococcus neoformans* capsule biosynthesis and regulation. *FEMS Yeast Res.* v.4, n 8, p:765-71, 2004.

JARVIS, J. N.; HARRISON, T. S. HIV-associated cryptococcal meningitis. *AIDS*, v. 21, p. 2119–2129, 2007.

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

JONG, A.; WU, C. H.; CHEN, H. M.; LUO, F.; KWON-CHUNG, K. J.; CHANG, Y. C.; CRAIG W.; LAMUNYON, A. P.; SHENG-HE, H. Identification and characterization of CPS1 as a hyaluronic acid synthase contributing to the pathogenesis of *C. neoformans* infection. *Eukaryot Cell*, v. 6, n. 8, p. 1486–1496, 2007.

KAWAKAMI, K.; SHIBUYA, K.; QURESHI, M. H.; ZHANG, T.; KOGUCHI, Y.; TOHYAMA, M. Chemokine responses and accumulation of inflammatory cells in the lungs of mice infected with highly virulent *Cryptococcus neoformans*: effects of interleukin-12. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* v. 25, n. 4, p. 391-402, 1999.

KHAWCHAROENPORN, T.; APISARNTHANARAK, A.; MUNDY L. M. Non-*neoformans* cryptococcal infections: a systematic review. *Infection*, v. 35, p. 51-57, 2007.

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

[KIDD, S.E.](#); [CHOW, Y.](#); [MAK, S.](#); [BACH, P.J.](#); [CHEN, H.](#); [HINGSTON, A.O.](#); [KRONSTAD, J.W.](#); BARTLETT, K.H. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the

Pacific Northwest of the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 5, p. 1433–1443, 2007.

KIERTIBURANAKUL, S.; WIROJTANANUGOON, S.; PRACHARKTAM, R.; SUNGKANUPARPH, S. Cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients. *Int J Infect Dis* v.10, p. 72-8, 2006.

KIM, B.; SHENOY, A. R.; KUMAN, P.; BRADFIELD, C. J.; MACMICKING, J. D. IFN-Inducible GTPases in Host Cell Defense. *Cell host & microbe*, v. 12, n. 18, p: 432–444. 2012.

KLEIN, C.; KUCHLER, K.; VALACHOVIC, M. ABC proteins in yeast and fungal pathogens. *Essays Biochem.*, v. 50, p: 101–119, 2011.

KLUTTS, J. S.; LEVERY, S. B.; DOERING, T. L. A beta-1,2-xylosyltransferase from *Cryptococcus neoformans* defines a new family of glycosyltransferases. *J. Biol. Chem.*, v. 282, p: 17890–17899. 2007.

KLUTTS, J. S.; DOERING, T.L. Cryptococcal xylosyltransferase 1 (Cxt1p) from *Cryptococcus neoformans* plays a direct role in the synthesis of capsule polysaccharides. *J. Biol. Chem.*, v. 283, p: 14327–14334. 2008.

KOKS, C. H.; MEENHORST, P. L.; HILLEBRAND, M. J.; BULT, A.; BEIJNEN, J. H. Pharmacokinetics of fluconazole in saliva and plasma after administration of an oral suspension and capsules. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 40, p. 1935-1937, 1996.

KOZEL, T.R.; MASTROIANNI, R.P. Inhibition of phagocytosis by cryptococcal polysaccharide: dissociation of the attachment and ingestion phases of phagocytosis. *Infection and Immunity*, v.14, n 1, p: 62–67, 1976.

KROCKENBERGER, M. B.; CANFIELD, P. J.; MALIK, R. *Cryptococcus neoformans* in the koala (*Phascolarctos cinereus*): Colonization by Cn. var. *gattii* and investigation of environmental sources. *Med. Mycol.*, v. 40, p. 263–272, 2002.

KWAN, L.C.; MEDOFF, G.; COBAYASHI, S. Protentation of the antifungal effects to antibiotics by amphotericin B. *Antimicrob Ag.Chemother.v.2*, p. 61, 1972.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT J.E. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *American Journal of Epidemiology*, v.120, n.1, p:123–30, 1984.

KWON-CHUNG, K. J.; RHODES, J. C. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, v. 51, p. 218-223, 1986.

KWON-CHUNG, K. L.; BOEKHOUT, T.; FELL, J. W.; DIAZ, M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurians* and *C. bacillisporus* (basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon*, v. 51, p. 804-806, 2002.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINZ-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. Criptococose. In: \_\_\_\_\_. *Tratado de Micologia Médica*. 9 ed. São Paulo: Sarvier, cap. 17, p. 416-440, 2002.

LANE, M.; MCBRIDE, J.; ARCHER, J. Steroid responsive late deterioration in *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* meningitis. *Neurology* v 63, p: 713–4,2004.

LARSEN, R. A.; BAUER, M.; THOMAS, A. M.; GRAYBILL, J. R. Amphotericin B and fluconazole, a potent combination therapy for cryptococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* v. 48, p. 985–991, 2004.

LARSEN, R. A.; PAPPAS, P. G.; PERFECT, J.; ABERG, J. A.; CASADEVALL, A.; CLOUD, G. A.; JAMES, R.; FILLER, S.; DISMUKES, W. E. Phase I Evaluation of the Safety and Pharmacokinetics of Murine-Derived Anticryptococcal Antibody 18B7 in Subjects with Treated Cryptococcal Meningitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, USA, v. 49, n. 3, p. 952–958,2005.

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

LAZÉRA, M. S.; IGREJA, R. P.; WANKE, B. Criptococose. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Micologia Médica à Luz de Autores Conterporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap 24, p. 252-264, 2004.

LEAL, A.L.; FAGANELLO, J.; FUENTEFRIA, A. M.; BOLDO, J. T.; BASSANESI, M. C.; VAINSTEIN, M. H. Epidemiological Profile of Cryptococcal Meningitis Patients in Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia*, v. 166, n. 2, p.71-75, 2008.

LINDENBERG, A. S. C.; CHANG, M. R.; PANIAGO, A. M. M. M.; LAZÉRA, M. S.; MONCADA, P. M. F.; BONFIM, G. F.; NOGUEIRA, S. A.; WANKE, B. Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, São Paulo, v. 50, n. 2, 2008.

LIU, L.; WAKAMATSU, K.; ITO, S.; WILLIAMSON, P. Catecholamine oxidative products, but not melanin, are produced by *Cryptococcus neoformans* in mice. *Infect Immun*, v. 67, p. 108-12, 1999.

LOMES, N.R.; MELHEM, M.S.C.; SZESZS, M.W.; MARTINS, M.A.; BUCCHERI, R. Cryptococcosis in non-HIV/non-transplant patients: A Brazilian case series. *Medical Mycology*.v.54, n 5, 2016.

LUPO, P.; CHANG, Y. C.; KELSALL, B. L.; FARBER, J. M.; PIETRELLA, D.; VECCHIARELLI, A.; LEON, F.; KWON-CHUNG, K. J. The presence of capsule in *Cryptococcus neoformans* influences the gene expression profile in dendritic cells during interaction with the fungus. *Infection and Immunity*, v. 76, n. 4, p. 1581– 1589, 2008.

MA, H.; CROUDACE, J. E.; LAMMAS, D. A.; MAY, R. C. Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages. *Curr.Biol.* v. 16, n. 21, p. 2156–2160, 2006.

MA, F.; MAY, R.C. Virulence in *Cryptococcus* Species. In Allen I. Laskin, A.I.; Sariaslani, S.; Gadd, G.M. *Advances in Applied Microbiology*, v. 67, Burlington: Academic Press, p. 131-190, 2009.

MANSOUR, M. K.; VYAS, J. M.; LEVITZ, S. M. Dynamic virulence: real-time assessment of intracellular pathogenesis links *Cryptococcus neoformans* phenotype with clinical outcome. *mBio* v. 2, n. 5, 2011.



MARIANI, M.M.; KIELIAN, T. Microglia in Infectious Diseases of the Central Nervous System. *J Neuroimmune Pharmacol.* v. 4, n.4, p. 448–461, 2009.

MARIANO, A. R.; MONTEIRO, A. G.; ALEXANDRE, D. G.; VES MELO, B. C. Glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans* exacerbates in vitro yeast cell growth y interleukin 10-dependent inhibition of CD4+ T lymphocyte responses. *Cell.Immunol.*,v. 222, n. 2, p. 116-125, 2003.

MARQUES, A.F.; SILVA, M.B.; JULIANO, M.A.P.; MUNHÕZA, J.E.; TRAVASSOS, L.R.; TABORDA, C.P. Additive effect of P10 immunization and chemotherapy in anergic mice challenged intratracheally with virulent yeasts of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes and Infection.* v. 10, n 12–13, p:1251–1258, 2008.

MARR, K. A. *Cryptococcus gattii* as an important fungal pathogen of western North America. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 10, n. 6, p. 637-643, 2012.

MARTINS, L. M. S.; WANKE, B.; LAZÉRA, M. S.; TRILLES, L.; BARBOSA, G. G.; MACEDO, R. C. L.; CAVALCANTI, M. A. S.; EULÁLIO, K. D.; CASTRO, J. A. F.; SILVA, A. S.; NASCIMENTO, F. F.; GOUVEIA, V. A.; MONTE, S. J. H. Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piauí (northeastern Brazil). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 106, n. 6, 2011.

MEGSON, G. M.; STEVENS, D. A.; HAMILTON, J. R.; DENNING, D. W. D-mannitol in cerebrospinal fluid of patients with AIDS and cryptococcal meningitis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, n. 1, p. 218–221, 1996.

MENDES, F. E. S.; OLIVEIRA, L. V. N.; FARIA, E. S.; ALVARENGA, D. G.; PINTO; M. R.; TABORDA; C. P.; SOARES, B. M.; CISALPINO, P. S.; SANTOS, D. A. Correlation of the in vitro antifungal drug susceptibility with the in vivo activity of fluconazole in a murine model of cerebral infection caused by *Cryptococcus gattii*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 29, n. 12, p. 1525-1532, 2010.

MERSHON, K. L.; VASUTHASAWAT, A.; LAWSON, G. W.; MORRISON, S. L.; BEENHOUWER, D. O. Role of Complement in Protection against *Cryptococcus gattii* Infection. *Infection and Immunity*, USA, v. 77, n. 3, p. 1061–1070, 2009.

MEYER, W.; CASTAÑEDA, A.; JACKSON, S.; HUYNH, M; CASTAÑEDA, E. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerging Infectious Diseases*, v. 9, n. 2, p. 189–195, 2003.

MEYER, W.; AANENSEN, DM.; BOEKHOUT, T.; COGLIATI, M.; DIAZ, MR.; ESPOSTO, MC.; et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *J Med Mycol*. v.47, p: 561–70, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). Programa Nacional de DST/AIDS. Boletim Epidemiológico. Brasília-DF, Ano XVII, n. 1, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). Vigilância e epidemiologia da criptococose. Brasília-DF, abril. 2012.

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

MORETTI, M. L.; RESENDE, M. R.; LAZERA, M. S.; COLOMBO, A. L.; SHIKANAI-YASUDA, M.A. Consenso em criptococose. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.41, n.5, p. 524-544, 2008.

MUKHOPADHYAY, S. Role of histology in the diagnosis of infectious causes of granulomatous lung disease. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, v 17, n 3, p: 189-196, 2011.

MURPHY, J. W.; MOORHEAD, J. W. Regulation of cellmediated immunity in cryptococcosis. I. Induction of specific afferent T suppressor cells by cryptococcal antigen. *The Journal of Immunology*, v.128, n 1, p: 276–283, 1982.

NAKAMURA, K.; MIYAGI, K.; KOGUCHI, Y.; KINJO, Y.; UEZU, K.; KINJO, T. Limited contribution of Toll-like receptor 2 and 4 to the host response to a fungal infectious pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 47, p: 148-154. 2006.

NARASIPURA, S.D.; CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S. Characterization of *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* SOD2 reveals distinct roles of the two superoxide dismutases in fungal biology and virulence. *Molecular Microbiology*, v.55, n 6, p: 1782–1800, 2005.

NASCIMENTO, E.; BONIFÁCIO da SILVA, M. E. N.; MARTINEZ, R.; VON ZESKA KRESS, M. R. Primary cutaneous cryptococcosis in an immunocompetent patient due to *Cryptococcus gattii* molecular type VGI in Brazil: a case report and review of literature. *Mycoses*, v. 57, p: 442–447. 2014.

NEVES, R.P.; LIMA NETO, R.G.; LEITE, M.; SILVA, V.K.A.; SANTOS, F.A.G.; MACÊDO, D.P.C. *Cryptococcus laurentii* fungaemia in a cervical cancer patient. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.19, n 6, p: 660-663, 2015.

NGAMSKULRUNGROJ, P.; PRICE, J.; SORRELL, T.; PERFECT, J. R.; MEYER, W. *Cryptococcus gattii* virulence composite: candidate genes revealed by microarray analysis of high and less virulent Vancouver island outbreak strains. *PloS one*, v. 6, n. 1, p. e16076, 2011.

NIIMI, K.; MAKI, K.; IKEDA, F.; HOLMES, A.R.; LAMPING, E.; NIIMI, M.; MONK, B.C.; CANNON, R.D. Overexpression of *Candida albicans* CDR1, CDR2, or MDR1 does not produce significant changes in echinocandin susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, p: 1148–1155. 2006.

NISHIKAWA, M. M.; LAZERA, M. S.; BARBOSA, G. G.; TRILLES, L.; BALASSIANO, B. R.; MACEDO, R. C.; BEZERRA, C. C.; PEREZ, 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.*, v. 41, p. 73–77, 2003.

NOSANCHUK, J.D.; CASADEVALL, A. Cellular charge of *Cryptococcus neoformans*: contributions from the capsular polysaccharide, melanin, and monoclonal antibody binding. *Infection and Immunity*, v. 65, n 5, p: 1836–1841, 1997.

OLIVEIRA, B. P. R. Criptococose.cap 49 p 750 In: Leão, R.N.Q.; Bichara, C.N.C.; Miranda, E.C.B.M.; Carneiro, I.C.R.S.; Oliveira, M.R.F., Abdon, N.P., Vasconcelos, P.F.C., Silva, B.M., Paes, A.L.V., Marsola, L.R. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico Belém: Cejup: UEPA: Instituto EvandroChagas, 886p., 1997.

OLIVEIRA, D.B; ALMEIDA, G.M.F; GUEDES, A.C.M.; SANTOS, F.P.S.T.; BONJARDIM, C.A.; FERREIRA, P.C.P.;KROON, E.G.Basal Activation of Type I Interferons (Alpha2 and Beta) and 2'5'OAS Genes: Insights into Differential Expression Profiles of Interferon System Components in Systemic Sclerosis. *International Journal of Rheumatology*:1-6, 2011.

OLSZEWSKI, M.A.; HUFFNAGLE, G. B.; MCDONALD, R. A.; LINDELL, D. M.; MOORE, B. B.; COOK, D. N. The role of macrophage inflammatory protein-1 alpha/CCL3 in regulation of T cell-mediated immunity to *Cryptococcus neoformans* infection.*J. Immunol.*, v. 165, n. 11, p. 6429-6436, 2000.

OLSZEWSKI, M.A.; HUFFNAGLE, G.B.; TRAYNOR, T.R.; MCDONALD, R.A.; COOK, D. N.; TOEWS, G. B. Regulatory effects of macrophage inflammatory protein 1alpha/CCL3 on the development of immunity to *Cryptococcus neoformans* depend on expression of early inflammatory cytokines. *Infect. Immun.*, v. 69, n. 10, p. 6256-6263, 2001.

O'MEARA, T.R.; ALSPAUGH, J. A.The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. *Clinical microbiology reviews*, v. 25, n. 3, p. 387-408, 2012.

ORSI, C. F.; COLOMBARI, B.; ARDIZZONI, A.; PEPPOLONI, S.; NEGLIA, R.; POSTERARO, B.; MORACE, G.; FADDA, G.; BLASI, E. The ABC transporter-encoding gene AFR1 affects the resistance of *Cryptococcus neoformans* to microglia-mediated antifungal activity by delaying phagosomal maturation. *FEMS Yeast Res*, v. 9, p. 301–310, 2009.

PAPPALARDO, M. C. S. M.; PASCHOAL, R. C.; MELHEM, M. S. C. AIDS-associated central nervous system cryptococcosis: a Brazilian case study. *Research Letters.AIDS*, v. 21, p. 1971-2, 2007.

PAPPALARDO, M. C. S. M.; SZESZS, M. W.; MARTINS, M. A.; BACETI, L. B.; BONFIETTI, L. X.; PURISCO, S. U.; BAEZ, A. A.; MELHEM, M. S. C. Susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B using time-kill methodology. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 64, p. 146–151, 2009.

PAPPALARDO, M. C. S. M. Parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos da anfotericina B e fluconazol e sua contribuição no estudo da correlação clínicolaboratorial de criptococose de sistema nervoso central associada à Aids. 2009. 147 f. Tese (doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo. 2009.

PECK, A.; MELLINS, E. D. Precarious balance: Th17 cells in host defense. *Infect Immun*, v. 78, p: 32-38. 2010.

PEDROSO, R.S. Caracterização molecular, virulência e suscetibilidade ao fluconazol de espécies ambientais de *Cryptococcus*, antes e após inoculação em modelo murino. Tese de doutorado. Ribeirão preto, SP, 2010.

PEETERMANS, W.; BOBBAERS, H.; VERHAEGEN, J.;VANDEPITTE, J. Fluconazole-resistant *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in an AIDS patient. *Acta Clin.Belg.*v. 48, n. 6, p. 405-409, 1993.

PEREA, S.; PATTERSON, T.F. Antifungal resistance in pathogenic fungi.*Antimicrobial Resitance*, v.15, p. 1073-1080, 2002.

PERFECT, J. R.; DURACK, D. T. Penetration of imidazoles and triazoles into cerebrospinal fluid of rabbits.*J. Chemother.* v. 16, p. 81-86, 1986.

PERFECT, J. R. Cryptococcosis.*Infect. Dis. Clin. North.Am.*, v. 3, p. 77–102, 1989.

PERFECT, J.R.; COX, G.M. Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. *Drug Resistance Updates*, v.2, p. 259 – 269, 1999.

PHILLIPS, P.; CHAPMAN, K.; SHARP, M.; HARRISON, P.; VORTEL, J.; STEINER, T.; BOWIE, W. Dexamethasone in *Cryptococcus gattii* Central Nervous System Infection. *Clin Infect Dis*. V. 49, n 4, p:591-595, 2009.

PINTO JUNIOR, V. L.; PONE, M. V. S.; PONE, S. M.; CAMPOS, J. M. S.; GARRIDO, J. R. P.; BARROS, A. C. M. W.; TRILLES, L.; BARBOSA, G. G.; MORALES, B. P.; BEZERRA, C. C. F.; LAZÉRA, M. S. *Cryptococcus gattii* tipo molecular VGII como agente causador de meningoencefalite em criança saudável no Rio de Janeiro, Brasil: relato de um caso autóctone. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, v. 43, n. 6, 2010.

PONTÓN, J.; QUINDÓS, G. Mecanismos de resistencia a la terapéutica antifúngica. *Med Clin*, Barcelona, v. 126, p. 56-60, 2006.

POSTERARO, B.; SANGUINETTI, M.; SANGLARD, D.; LA SORDA, M.; BOCCIA, S.; ROMANO, L.; FADDA, G. Identification and characterization of a *Cryptococcus neoformans* ATP binding cassette (ABC) transporter-encoding gene, CnAFR1, involved in the resistance to fluconazole. *Molecular microbiology*, v. 47, n. 2, p. 357-371, 2003.

QIN, H.J.; FENG, Q.M.; FANG, Y.; SHEN, L. Type-I interferon secretion in the acute phase promotes *Cryptococcus neoformans* infection-induced Th17 cell polarization in vitro. *Experimental and therapeutic medicine*, v. 7, n. 4, p. 869, 2014.

REARDON, C. C.; KIM, S. J.; WAGNER, R. P.; KORNFELD, H. Interferon-gamma reduces the capacity of human alveolar macrophages to inhibit growth of *Cryptococcus neoformans* in vitro. *Am. J. Respir. Cell.Mol. Biol.* v. 15, n. 6, p. 711-715, 1996.

REVANKAR, S. G.; FU, J.; RINALDI, M. G.; KELLY, S. L.; KELLY, D. E.; LAMB, D. C.; KELLER, S. M.; WICKES, B. L. Cloning and characterization of the lanosterol 14alpha-demethylase (ERG11) gene in *Cryptococcus neoformans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 324, p. 719 –728, 2004.

REZENDE, C.; MUNHÓZ, C. J. M.; ALMEIDA G. G. de. Investigação Ambiental de *Cryptococcus neoformans* na Cidade de Votuporanga – São Paulo. *NewsLab*, Brasil, ed. 87, p. 88-93, 2008.

RIPPON, J. W. *Medical Mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes*. Third ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 1988.

ROGERS, D.C.; PETERS, J.; MARTIN, J.E. et al. SHIRPA, a protocol for behavioral assessment: validation for longitudinal study of neurological dysfunction in mice. *Neuroscience Letters*, v. 306, p. 89-92. 2001.

ROSSI, S. A. Caracterização do gene ERG11 envolvido na resistência de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* às drogas azólicas e identificação de novos alvos a partir de produtos naturais. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) – Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, São Paulo. 2011.

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. *Journal of Medical Microbiology*, v. 49, n 8, p: 733–737, 2000.

SAAG, M. S.; DISMUKES, W. E. Azole antifungal agents: emphasis on new triazoles. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 32, p. 1- 8, 1988.

SANGLARD, D. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, Switzerland, v. 20, n. 9. p. 462-470, 2002.

SANTOS, J. R. A.; GOUVEIA, L. F.; TAYLOR, E. L. S.; RESENDE-STOIANOFF, M. A.; PIANETTI, G. A.; CÉSAR, I. C.; SANTOS, D. A. Dynamic Interaction between Fluconazole and Amphotericin B against *Cryptococcus gattii*. *Antimicrob. Agents Chemother*, v. 56, n. 5, p. 2553-2558, 2012.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LA SORDA, M.; TORELLI, R.; Fiori, B.; SANTANGELO, R.; DELOGU, G.; FADDA, G. Role of AFR1, an ABC transporter-

encoding gene, in the in vivo response to fluconazole and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, v. 74, p: 1352–1359. 2006.

SCEMLA, A.; GERBER, S.; DUQUESNE, A.; PARIZE, P.; MARTINEZ, F.; ANGLICHEAU, D., et al. Dramatic improvement of severe cryptococcosis-induced immune reconstitution syndrome with adalimumab in a renal transplant recipient. *Am J Transplant* v 15, p: 560–564, 2015.

SEATON, R.A.; VERMA, N.; NARAQI, S.; WEMBRI, J.P.; WARRELL, D.A. The effect of corticosteroids on visual loss in *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* meningitis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* v 91, p:50–52, 1997.

SHAO, X.; MEDNICK, A.; ALVAREZ, M.; VAN, R. N.; CASADEVALL, A.; GOLDMAN, D. L. An innate immune system cell is a major determinant of species related susceptibility differences to fungal pneumonia. *J. Immunol.*,v. 175, n. 5, p. 3244-3251, 2005.

SHAW, C.E.; KAPICA, L. Production of diagnostic pigment by phenoloxidase activity of *Cryptococcus neoformans*. *Applied Microbiology*, v. 24, n 5, p: 824–830, 1972.

SHEPPARD, D.; LAMPIRIS, H.W. Fármacos Antifúngicos. In: KATZUNG, B.G. Farmacologia Básica e Clínica. 9ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.48, p:709-716, 2005.

SHIBUYA, M.; CLAEISSON-WELSH, L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res*. v. 312, p.549-560, 2006.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 50-62, 2004.

SINGH, A.; PANTING, R. J.; VARMA, A.; SAIJO, T.; WALDRON, K. J.; JONG, A.; NGAMSKULRUNGROJ, P.; CHANG, Y.C.; RUTHERFORD, J. C.; KWON-CHUNG; K. J. Factors required for activation of urease as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans*. *MBio*, v. 4, n. 3, p. e00220-13, 2013.



SILVA, P. R.; RABELO, R. A. S.; TERRA, A. P. S.; TEIXEIRA, D. N. S. Suscetibilidade a antifúngicos de variedades de *Cryptococcus neoformans* isoladas de pacientes em hospital universitário. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasil*, v. 41, n. 2, p. 158-162, 2008.

SIONOV, E.; LEE, H.; CHANG, Y.C.; KWON-CHUNG, K.J. *Cryptococcus neoformans* overcomes stress of azole drugs by formation of disomy inspecific multiple chromosomes. *PLoS Pathog.* v. 6, n.4, 2010.

SIONOV, E.; CHANG, Y. C.; GARRAFFO, H. M.; DOLAN, M. A.; GHANNOUM M. A.; KWON-CHUNG K. J. Identification of a *Cryptococcus neoformans* Cytochrome P450 Lanosterol 14 $\alpha$ -Demethylase (Erg11) Residue Critical for Differential Susceptibility between Fluconazole/Voriconazole and Itraconazole/Posaconazole. *Antimicrob.Agents Chemother.*v. 56, n. 3, p. 1162-1169, 2012.

SIONOV, E.; CHANG, Y.C.; KWON-CHUNG, K. J. Azole heteroresistance in *Cryptococcus neoformans*: emergence of resistant clones with chromosomal disomy in the mouse brain during fluconazole treatment. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 57, n. 10, p. 5127-5130, 2013.

SIONOV, E.; MAYER-BARBER, K.D.; CHANG, Y.C.; KAUFFMAN, K.D.; ECKHAUS, M.A.; SALAZAR, A.M., et al. Type I IFN Induction via Poly-ICLC Protects Mice against Cryptococcosis. *PLoS Pathog* v 11, n 8, p: e1005040, 2015.

SITAPATI, A.M.; KAO, C.L.; CACHAY, E.R.; MASOUMI, H.; WALLIS, R.S.; MATHEWS, W.C. Treatment of HIV-related inflammatory cerebral cryptococcoma with adalimumab. *Clin Infect Dis* v50: e7–10, 2010.

SMITH, K.D.; ACHAN, B.; HULLSIEK, K.H.; MCDONALD, T.R.; OKAGAKI, L.H.; ALHADAB, A.A.; AKAMPURIRA, A.; RHEIN, J.R.; MEYA, D.B.; BOULWARE, D.R.; NIELSEN, K.; Increased Antifungal Drug Resistance in Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* in Uganda. *Antimicrob.Agents Chemother.* v. 59, n 12, p: 7197-7204, 2015.

SOARES, B. M.; SANTOS, D. A.; KOHLER, L. M.; CÉSAR, G. C.; CARVALHO, I. R. de; MARTINS, M. A.; CISALPINO, P. S. Cerebral infection caused by *Cryptococcus gattii*: a case report and antifungal susceptibility testing. *Revista Iberoamericana de Micologia*, Brasil, v. 25, p. 242-245, 2008.

SORRELL, T.C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Medical Mycology*, v. 39, n. 2, p. 155–168, 2001.

SPEED, B.; DUNT, D. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Infect. Dis.*, v. 21, p. 28–34; discussion 35–26, 1995.

SPIES, F.S.; OLIVEIRA, M.B.; KRUG, M.S.; SEVERO, C.B.; SEVERO, L.C.; VAINSTEIN, M.H. Cryptococcosis in patients living with hepatitis C and B viruses. *Mycopathologia*.v.179, n 3,p:307-312,2015.

SPRINGER, D. J.; CHATUVEDI, V. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. *Emer. Infect. Dis.*, v.16, n.1, p. 14-20, 2010.

TAY, S. T.; TANTY, H. T.; NG, K. P.; ROHANI, M. Y.; HAMIMAH, H. *In vitro* susceptibilities of Malaysian clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* to five antifungal drugs. *Mycoses*, v. 49, p. 324-30, 2006.

TERREL, C. L. Antifungal Agents. Pat. II The Azoles. *Cli. Proc.* v.100, p.74-78, 1999.

THORNEWELL, S.J.; PEERY, R.B.; SKATRUD, P.L. Cloning and characterization of Cn e MDR1: a *Cryptococcus neoformans* gene encoding a protein related to multidrug resistance proteins. *Gene*, v. 201, p: 21–29. 1997.

TINTELNOT, K.; LEMMER, K.; LOSERT, H.; SCHÄR, G.; POLAK, A. Follow-up of epidemiological data of cryptococcosis in Austria, Germany and Switzerland with special focus on the characterization of clinical isolates. *Mycoses*, v. 47, n. 11- 12, p. 455–464, 2004.

THOMPSON III, G.R., WIEDERHOLD, N.P., NAJVAR, L.K., BOCANEGRA, R., KIRKPATRICK, W.R., GRAYBILL, J. R.; PATTERSON, T. F. A Murine model of

*Cryptococcus gattii* meningoencephalitis. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, p. dks060, 2012.

TREJO, W. H.; BENNETT, R. E. *Streptomyces nodosus* sp. The amphotericin producing organism. *J. Bacteriol.* v.85, p. 436-439, 1963.

TRINCHIERI, G. Type I interferon: friend or foe? *J. Exp. Med.*, v.207, p: 2053–2063, 2010.

TRILLES, L.; LAZÉRA, M. S.; WANKE, B.; OLIVEIRA, R. V.; BARBOSA, G. G.; NISHIKAWA, M. M.; MORALES, B. P.; MEYER, W. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 103, p. 455-462, 2008.

TRILLES, L.; MEYER, W.; WANKE, B.; GUARRO, J.; LAZÉRA, M S. Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex. *Medical Mycology*, p. 1-5, aug. 2011.

URAI, M.; KANEKO, Y.; UENO, K.; OKUBO, Y.; AIZAWA, T.; FUKAZAWA<sup>1</sup>, H.; SUGITA, T.; OHNO, H.; SHIBUYA, H.; KINJO, Y.; MIYAZAKI, Y. Evasion of innate immune responses by the highly virulent *Cryptococcus gattii* by altering capsule glucuronoxylomannan structure. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. v. 5, p: 1-11, 2016.

VANBREUSEGHEM, R.; TAKASHIO, M. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894. II. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Ann Soc Belg Med Trop*, v. 50, n. 6, p. 695-702, 1970.

VANDEN, B. H.; DROMER, F.; IMPROVISI, I.; LOZANO-CHIU, M.; REX, J. H.; SANGLARD, D. Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. *Med. Mycol.*, v. 36 Suppl 1, p. 119-128, 1998.

VARMA, A.; KWON-CHUNG, K.J. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 54, p: 2303–2311, 2010.

VECCHIARELLI, A.; RETINI, C.; PIETRELLA, D. et al. Downregulation by cryptococcal polysaccharide of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 $\beta$  secretion from human monocytes. *Infection and Immunity*, v. 63, n 8, p: 2919–2923, 1995.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. *Infection and Immunity*, v. 63, n 8, p: 3131–3136, 1995.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. *Applied and Environmental Microbiology*. v.60, n 10, p: 3864–3866, 1994.

WASHBURN, R. G.; BRYANT-VARELA, B. J.; JULIAN, N. C.; BENNETT, J. E. Differences in *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide structure influence assembly of alternative complement pathway C3 convertase on fungal surfaces. *Mol.Immunol.*,v. 28, n. 4-5, p. 465-470, 1991.

WHITE, M. H.; ARMSTRONG, D. Cryptococcosis. *Infect.Dis.Clin.North Am.*, v. 8, n. 2, p. 383-398, 1994.

WHITE, T. C. The presence of an R467K amino acid substitution and loss of allelic variation correlate with an azole-resistant lanosterol 14-alpha-demethylase in *Candida albicans*. *Antimicrob.Agents Chemother*, v. 41, p. 1488–1494, 1997.

WHITE, T. C.; KIEREN, A. M.; BOWDEN, R. A. Clinical, cellular, and molecular factor that contribute to antifungal drug resistance. *Clin.Microbiol.Reviews*, v. 11, p. 382-02, 1998.

WILSON, D. E.; BENNETT, J. E.; BAILEY, J. W. Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. *Proc Soc Exp Biol Med*, v. 127, p. 820-823, 1968.

WOHLSCHLAGER, T.; BUSER, R.; SKOWYRA, M.L.; HAYNES, B. C.; HENRISSAT, B.; DOERING, T.L.; KÜNZLER, M.; AEBI, M. Identification of the galactosyltransferase of *Cryptococcus neoformans* involved in the biosynthesis of basidiomycete-type glycosyl inositol phosphor ceramide. *Glycobiology* v. 23, n. 11, p:1210-1219. 2013.

WORMLEY, F. L. Jr.; PERFECT, J. R. Immunology of infection caused by *Cryptococcus neoformans*. *Methods Mol. Med.*, v. 118, p. 193-198, 2005.

YANG, M.L.; UHRIG, J.; VU, K.; SINGAPURI, A.; DENNIS, M.; GELLI, A.; THOMPSON III, G.R. Fluconazole Susceptibility in *Cryptococcus gattii* is dependent on the ABC transporter Pdr11. *Antimicrob. Agents Chemother.* v.60, n 3, p: 1202-1207, 2016.

YAUCH, L. E.; LAM, J. S.; LEVITZ, S. M. Direct inhibition of T-cell responses by the *Cryptococcus* capsular polysaccharide glucuronoxylomannan. *PLoS Pathogens*, v.2, n 11, p: 1060–1068, 2006.

YOUNG, B.J.; KOZEL, T.R. Effects of strain variation, serotype, and structural modification on kinetics for activation and binding of C3 to *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.*, v. 61, n. 7, p. 2966-2972, 1993.

ZAGURY, D.; LACHGAR, A.; CHAMS, V.; FALL, L.S.; BERNARD, J.; ZAGURY, J.F.; BIZZINI, B.; GRINGERI, A.; SANTAGOSTINO, E.; RAPPAPORT, J.; FELDMAN, M.; BURNY, A.; GALLO, R.C. Interferon  $\alpha$  and Tat involvement in the immunosuppression of uninfected T cells and C-C chemokine decline in AIDS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v. 95, n. 7, p: 3851-3856, 1998.

## ANEXO 1

**Assunto: Decisão do CEUA**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA**  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Senhor(a) Professor(a) Daniel de Assis Santos,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto Avaliação do desenvolvimento de resistência ao fluconazol in vivo em modelo animal de criptococose causada por *Cryptococcus gattii*, submetido a esta comissão pelo protocolo 312 / 2012, a CEUA decidiu **aprovar** a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado na reunião do dia 05/12/2012.

Para acessar ao seu projeto clique no link:

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Belo Horizonte, 06/12/2012.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais

Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha

Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005

31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil

Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592

[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

## ANEXO 2

**Assunto: Total de proteínas identificadas para cada grupo estudado**

<b>IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS</b>			
	<b>WT</b>	<b>L27/NT</b>	<b>L27/FLC</b>
1	Cgwm2.001200	Cgwm2.000450	Cgwm2.001690
2	Cgwm2.001830	Cgwm2.001950	Cgwm2.005210
3	Cgwm2.002090	Cgwm2.004110	Cgwm2.006070
4	Cgwm2.002330	Cgwm2.004800	Cgwm2.011110
5	Cgwm2.010750	Cgwm2.005150	Cgwm2.011980
6	Cgwm2.011190	Cgwm2.005420	Cgwm2.012020
7	Cgwm2.012450	Cgwm2.006070	Cgwm2.012950
8	Cgwm2.016050	Cgwm2.006560	Cgwm2.013550
9	Cgwm2.032500	Cgwm2.007100	Cgwm2.013600
10	Cgwm2.038560	Cgwm2.008540	Cgwm2.015070
11	Cgwm2.046190	Cgwm2.010950	Cgwm2.016780
12	Cgwm2.046270	Cgwm2.011050	Cgwm2.017010
13	Cgwm2.051530	Cgwm2.011290	Cgwm2.017380
14	Cgwm2.062950	Cgwm2.012950	Cgwm2.017620
15	Cgwm2.000870	Cgwm2.013110	Cgwm2.017830
16	Cgwm2.003830	Cgwm2.013430	Cgwm2.023980
17	Cgwm2.036350	Cgwm2.013550	Cgwm2.024320
18	Cgwm2.038660	Cgwm2.014440	Cgwm2.027040
19	Cgwm2.049260	Cgwm2.015170	Cgwm2.029460
20	Cgwm2.062090	Cgwm2.015350	Cgwm2.029630
21	Cgwm2.062330	Cgwm2.016780	Cgwm2.029720
22		Cgwm2.017010	Cgwm2.031780
23		Cgwm2.019570	Cgwm2.033590
24		Cgwm2.020390	Cgwm2.036050
25		Cgwm2.021990	Cgwm2.046030
26		Cgwm2.025290	Cgwm2.046550
27		Cgwm2.026560	Cgwm2.053320
28		Cgwm2.027440	Cgwm2.053460
29		Cgwm2.029720	Cgwm2.055390
30		Cgwm2.031830	Cgwm2.056910
31		Cgwm2.032930	Cgwm2.061850
32		Cgwm2.034030	Cgwm2.062620
33		Cgwm2.035280	Cgwm2.062930
34		Cgwm2.037130	Cgwm2.000870
35		Cgwm2.038770	Cgwm2.001830
36		Cgwm2.039300	Cgwm2.003830
37		Cgwm2.040940	Cgwm2.032500
38		Cgwm2.042710	Cgwm2.036350

**IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS**

	<b>WT</b>	<b>L27/NT</b>	<b>L27/FLC</b>
39		Cgwm2.044040	Cgwm2.049260
40		Cgwm2.044780	Cgwm2.062090
41		Cgwm2.045780	Cgwm2.062330
42		Cgwm2.046030	
43		Cgwm2.046780	
44		Cgwm2.047010	
45		Cgwm2.047090	
46		Cgwm2.048920	
47		Cgwm2.050570	
48		Cgwm2.053320	
49		Cgwm2.055810	
50		Cgwm2.055910	
51		Cgwm2.056350	
52		Cgwm2.056560	
53		Cgwm2.059420	
54		Cgwm2.059730	
55		Cgwm2.059830	
56		Cgwm2.060550	
57		Cgwm2.061210	
58		Cgwm2.061720	
59		Cgwm2.062110	
60		Cgwm2.062260	
61		Cgwm2.000870	
62		Cgwm2.003830	
63		Cgwm2.036350	
64		Cgwm2.038660	
65		Cgwm2.049260	
66		Cgwm2.062090	
67		Cgwm2.062330	



## ANEXO 3

### Assunto: Atividades desenvolvidas durante a Pós-Graduação

#### Artigos completos publicados em periódicos

- 1- BORATTO, P.; ALBARNAZ, J.D.; ALMEIDA, G.M.F.; BOTELHO, L.; FONTES, A. C. L.; COSTA, A.O.; SANTOS, D.A.; BONJARDIM, C.A.; LA SCOLA, B.; KROON, E.G.; ABRAHÃO, J.S. Acanthamoeba polyphaga Mimivirus Prevents Amoebal Encystment-Mediating Serine Proteinase Expression and Circumvents Cell Encystment. *Journal of Virology* (Print), v.89, p.2962 - 2965, 2015.
  
- 2- SANTOS, J.R.A.; HOLANDA, R.A.; FRASES, S.; BRAVIM, M.; ARAUJO, G.S.; SANTOS, P.C.; COSTA, M.C.; RIBEIRO, M.J.A.; FERREIRA, G.F.; BALTAZAR, L.M.; MIRANDA, A.S.; OLIVEIRA, D.B.; SANTOS, C.M.A.; FONTES, A.C.L.; GOUVEIA, L.F.; RESENDE-STOIANOFF, M.A.; ABRAHÃO, J.S.; TEIXEIRA, A.L.; PAIXÃO, T.A.; SOUZA, D.G.; SANTOS, D.A. Fluconazole Alters the Polysaccharide Capsule of *Cryptococcus gattii* and Leads to Distinct Behaviors in Murine Cryptococcosis. *Plos One*, v.9, p.e112669, 2014.

## ANEXO 4

### Assunto: Atividades desenvolvidas durante a Pós-Graduação Resumos apresentados em anais de eventos

1. FONTES, A. C. L.; OLIVEIRA, L. V. N.; BARCELLOS, V. A.; VAINSTEIN, M. H.; SANTOS, D. A. Alteration of *Cryptococcus gattii* virulence factors during infection intratracheal in murine model In: 28 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2015, Florianópolis. **Trabalho obteve Mérito Científico**
2. FONTES, A. C. L.; BARCELLOS, V. A.; SCHNEIDER, R. O.; SANTOS, D. A.; VAINSTEIN, M. H. Evaluate the susceptibility of *Cryptococcus gattii* in the presence and absence of fluconazole to macrophage phagocytosis activity In: 28 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2015, Florianópolis.
3. FONTES, A. C. L.; OLIVEIRA, L. V. N.; BARCELLOS, V. A.; VAINSTEIN, M. H.; SANTOS, D. A. Alteração dos fatores de virulência de *Criptococcus gattii* durante infecção intratraqueal em modelo murino In: II Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2015, Belo Horizonte.
4. RIBEIRO, N. Q.; FONTES, A. C. L.; MAGALHAES, T. F.; OLIVEIRA, L. V.; RESENDE-STOIANOFF, M. A.; SANTOS, D. A. Efeito da atorvastatina em modelo murino de criptococose In: Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2014, Belo Horizonte.
5. FONTES, A. C. L.; OLIVEIRA, DANILO BRETAS; ABRAHÃO, JÔNATAS SANTOS; SANTOS, D. A. Expressão do gene *erg11* em *Cryptococcus gattii* durante a criptococose In: I Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2014, Belo Horizonte.
6. OLIVEIRA, L. V.; COSTA, M. C.; RIBEIRO, N. Q.; SANTOS, J. R. A.; FONTES, A. C. L.; SANTOS, D. A. Terapia fotodinâmica para o tratamento da criptococose. In: Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2014, Belo Horizonte.
7. FONTES, A. C. L.; SANTOS, J. R. A.; RIBEIRO, M. J. A.; COSTA, M. C.; SILVA, D. L.; RESENDE-STOIANOFF, M. A.; SANTOS, D. A. Avaliação da resposta do modelo murino infectado por *Cryptococcus gattii* frente a diferentes dosagens de fluconazol In: IX Fórum de microbiologia, 2013, Belo Horizonte.

8. FONTES, A. C. L.; SANTOS, J. R. A.; RIBEIRO, M. J. A.; COSTA, M. C.; SILVA, D. L.; FREITAS, G. J. C.; GONCALVES, L. P.; RAMOS, L. H.; RESENDE-STOIANOFF, M. A.; SANTOS, D. A. Avaliação da resposta do modelo murino infectado por *Cryptococcus gattii* frente a diferentes dosagens de fluconazol In: 27 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal -RN.
  
9. SANTOS, J. R. A.; RAMOS, L. H.; RIBEIRO, M. J. A.; HOLANDA, R. A.; COSTA, M. C.; FONTES, A. C. L.; GONCALVES, L. P.; FREITAS, G. J. C.; RESENDE-STOIANOFF, M. A.; SANTOS, D. A. Determinação dos parâmetros farmacocinéticos do fluconazol para avaliação do tratamento da criptococose em modelo murino. In: 27 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal -RN.
  
10. FREITAS, G. J. C.; RIBEIRO, M. J. A.; SANTOS, J. R. A.; COSTA, M. C.; FONTES, A. C. L.; RESENDE-STOIANOFF, M. A.; SANTOS, D. A. Study of melanized *Cryptococcus gattii* infection in murine model In: 11 World congress on inflammation, 2013, Natal - RN.