

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia

GUSTAVO JOSÉ COTA DE FREITAS

**Influência da diversidade fenotípica de *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans* na
progressão da criptococose em modelo murino**

**Belo Horizonte
2018**

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia

GUSTAVO JOSÉ COTA DE FREITAS

**Influência da diversidade fenotípica de *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans* na
progressão da criptococose em modelo murino**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Daniel de Assis Santos

Co-orientadora: Ludmila de Matos Baltazar

**Belo Horizonte
2018**

“Senhores e senhoras, meu nome é Gustavo José, sou o discente responsável por esse voo. Em nome do meu orientador e da Micologia, vos apresento as boas-vindas a bordo do *Boing-280394*, voo do Planeta Áries com destino a Scorpion. Durante a viagem, em caso de incoerências gramaticais ou conceituais, canetas vermelhas caíram automaticamente. Puxe uma delas, posicione-a sobre uma das mãos e faça os comentários necessários. Essa aeronave possui uma estrutura resumida no sumário; em caso de dúvidas, acesse-o. Legendas com instruções detalhadas encontram-se abaixo de cada figura. Como medida preventiva, recomendamos que permaneça sentada durante toda a viagem, reservamos a melhor poltrona para você. Dentro de instantes, daremos início ao nosso serviço de bordo, nele está incluso o pacote *pubmed-food*, uma ótima opção para alimentar o seu cérebro durante todo o percurso.

Agradecemos a disponibilidade e desejamos a todos uma ótima viagem! ”

Gustavo José

RESUMO

Cryptococcus gattii e *C. neoformans* são as principais espécies do gênero *Cryptococcus* que apresentam relevância médica e veterinária. Esses microrganismos são ubíquos, e no contexto ambiental e do hospedeiro, enfrentam diversas pressões, tais como temperatura, pH, osmolaridade, baixa disponibilidade de nutrientes, hipóxia, fagocitose por amebas de vida livre, resposta imune do hospedeiro, entre outros. Considerando essa premissa, este estudo avaliou, para cinco linhagens de *C. gattii* e cinco de *C. neoformans*, *in vitro* e *in vivo*, a variação nos atributos relacionados à virulência e patogenicidade (susceptibilidade a antifúngicos, espessura da cápsula polissacarídica, tamanho da célula, pseudofilamentação, melanização, tolerância à temperatura, atividade das enzimas uréase e lacase) e demonstrou, em modelo murino de infecção, como esses fatores podem influenciar na virulência. Os dados obtidos demonstraram que a morfologia e o crescimento de *Cryptococcus* são extremamente variáveis conforme as condições de cultivo (meio e temperatura) e que nem sempre, alterações observadas *in vitro*, ocorrem *in vivo*. Nós vimos que o cultivo de *C. gattii* e *C. neoformans* em meios nutricionalmente pobres, como o Meio mínimo líquido (MM_L) e Meio mínimo líquido suplementado com Soro fetal bovino (MM_L + SFB10%), causa redução significativa ($p < 0,05$) do diâmetro celular e aumento ($p < 0,05$) da razão superfície volume (S/V) e espessura capsular em relação ao meio rico Sabouraud dextrose líquido (SD_L). Essa variação morfológica ocorre para que a célula consiga otimizar o seu metabolismo e aumentar o seu *fitness* reprodutivo. Para *C. gattii*, a linhagem WM179 foi a que apresentou maior espessura capsular no MM_L, assim como, para as linhagens WM628 e WM626 de *C. neoformans*. Em seguida nós investigamos a virulência em modelo murino de infecção. Contudo, o aumento da cápsula *in vitro* não foi determinante para a virulência, uma vez que nas análises de letalidade a linhagem WM179 foi pouco virulenta e apresentou carga fúngica reduzida no pulmão e não detectável no cérebro após 10 dias de infecção. Imediatamente após a infecção, há uma redução significativa do corpo celular, tanto para *C. gattii* quanto para *C. neoformans*, acreditamos que esse fator pode favorecer a passagem na barreira hematoencefálica e o acesso ao SNC. Em seguida, foi observada uma relação direta entre aumento da cápsula polissacarídica no pulmão e lavado broncoalveolar ao longo da infecção com a virulência das cepas de *C. neoformans*, mas não de *C. gattii*. Conclui-se que a virulência de *C. neoformans* e *C. gattii* está associada à diversidade fenotípica desse

microrganismo, principalmente para *C. neoformans*, em que variações morfológicas *in vivo* foram capazes de prever a virulência de cada linhagem.

Palavras-chave: Criptococose, *C. gattii*, *C. neoformans*, virulência, diversidade fenotípica, modelo murino.

ABSTRACT

Cryptococcus gattii and *C. neoformans* are the main species of the genus *Cryptococcus* that have medical and veterinary relevance. These microorganisms are ubiquitous and, in the environmental and host situation, face many stresses, such as temperature, pH, osmolarity, low nutrient availability, hypoxia, phagocytosis by free-living amoebas, host immune response, among others. This study evaluated the variation in virulence and pathogenicity attributes of five strains of *C. gattii* and five of *C. neoformans*, in vitro and in vivo, including: susceptibility to antifungal, polysaccharide capsule thickness, cell size, pseudofilamentation, melanization, temperature tolerance, activity of laccase and urease enzymes; and also demonstrated, in a murine model of infection, how these factors may influence virulence. It was demonstrated that the morphology and development of *Cryptococcus* are extremely variable according to the culture conditions (medium and temperature) and seldom, changes observed in vitro, occur in vivo. It was found that *C. gattii* e *C. neoformans* culture in nutritionally poor media, such as the Minimum Liquid Medium (MLM) and Minimum Liquid Medium supplemented with fetal bovine serum (MML + SFB10%), causes significant reduction ($p < 0.05$) of the cell diameter, increase ($p < 0.05$) the surface volume ratio (S / V) [D2] and capsular thickness if compared to the rich medium Sabouraud liquid dextrose (SLD). It was demonstrated that the morphology and development of *Cryptococcus* are extremely variable according to the culture conditions (medium and temperature) and seldom, changes observed in vitro, occur in vivo. It was found that *C. gattii* e *C. neoformans* culture in nutritionally poor media, such as the Minimum Liquid Medium (MLM) and Minimum Liquid Medium supplemented with fetal bovine serum (MML + SFB10%), causes significant reduction ($p < 0.05$) of the cell diameter, increase ($p < 0.05$) the surface volume ratio (S / V) and capsular thickness if compared to the rich medium Sabouraud liquid dextrose (SLD). This morphological variation turns the cell into an able system that optimizes its metabolism and increase its reproductive fitness. For *C. gattii*, the WM179 strain exhibited the highest capsular thickness in the MLM, as well as for the WM628 and WM626 strains of *C. neoformans*. In the next step the virulence in urine model of infection was investigated. However, the increase of the capsule in the in vitro system was not determinant for virulence, once in the lethality analyzes, the WM179 strain exhibited low virulence and had reduced fungal load in the lung and was undetectable in the brain after 10 days of infection. Immediately after

infection, there is a significant reduction of the cell body, both for *C. gattii* and *C. neoformans*, we believe that this factor can favor the passage through the blood-brain barrier and access to the CNS at the beginning of the infection. Then, a relation was observed between increase of the polysaccharide capsule in the lung and bronchoalveolar lavage during the infection with the virulence of *C. neoformans* strains, but it was not found in *C. gattii* strains. It is concluded that the virulence of *C. neoformans* and *C. gattii* is associated to the phenotypic diversity of this microorganism, mainly for *C. neoformans*, in which morphological variations in vivo were able to predict the virulence of each lineage.

Palavras-chave: Criptococose, *C. gattii*, *C. neoformans*, virulence, diversidade fenotípica, murine model.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FC: 5-flucitosina

ANB: Anfotericina B

ASD: Ágar Sabouraud Dextrose

SDL: Sabouraud Dextrose líquido

FEC-GM: Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos

MM: Meio mínimo

MLL: Meio mínimo líquido

MAT: *mating type*

ATCC: *American Type Culture Collection*

BHE: Barreira Hemato-Encefálica

CEUA/UFMG: Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais

CIM: Concentração Inibitória Mínima

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

GXM: Glucoronoxilomanano

GalXM: Galactoxilomanana

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

RNS: Espécies Reativas de Nitrogênio

RPMI-1640 - *Roswell Park Memorial Institute*

SNC: Sistema Nervoso Central

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Variação morfológica de <i>Cryptococcus</i> spp.....	10
Figura 2: Diversidade de nichos ecológicos de <i>Cryptococcus</i> spp.....	11
Figura 3: Distribuição global dos genótipos de <i>C. gattii</i>	22
Figura 4. Esquema de um teste de concentração inibitória mínima em placa de microdiluição de 96 poços.....	30
Figura 5. Curva de crescimento, em meio RPMI, SD _L e MM _L , a 28 e 37°C para as linhagens de <i>Cryptococcus neoformans</i> H99 (A), WM629 (B), WM628 (C), WM148 (D), WM626 (E) e todas as linhagens juntas (F).....	41
Figura 6. Curva de crescimento, em meio RPMI, SD _L e MM _L , a 28 e 37°C para as linhagens de <i>Cryptococcus gattii</i> WM779 (A), R265 (B), WM178 (C), WM148 (D), WM179 (E) e todas as linhagens juntas (F).....	42
Figura 7. Determinação da morfologia em meio SD _L , MM _L , MM _L +SFB10% a 37°C para as linhagens de <i>Cryptococcus neoformans</i> (A), (B) e (C), <i>C. gattii</i> (D), (E) e (F) e todas as linhagens juntas por espécie (G), (H) e (I). Preparações de nanquim de cepas representativas de cada espécie, evidenciando aumento na cápsula quando cultivadas em MM _L , MM _L +SFB10% a 37°C SD _L durante cinco dias em relação ao crescimento no SD _L a 37°C SD _L durante cinco dias (J). SD _L ou S: Sabouraud dextrose líquido; MM _L ou M: Meio mínimo líquido; MM _L +SFB 10% ou F: Meio mínimo líquido mais soro fetal bovino a 10%.....	44
Figura 8. Fundamentação matemática para o estabelecimento da proporção entre a cápsula polissacarídica e o corpo celular (A). Determinação dessa proporção em meio SD _L , MM _L , MM _L +SFB10% a 37°C para as linhagens de <i>Cryptococcus neoformans</i> (B), <i>C. gattii</i> (C) e todas as linhagens juntas por espécie (D). MM _L ou M: Meio mínimo líquido; MM _L +SFB 10% ou F: Meio mínimo líquido mais soro fetal bovino a 10%.....	46
Figura 9. Avaliação da influência de diferentes componentes do MM _L na formação de células irregulares para a linhagem WM779. Preparações de nanquim da linhagem de <i>C. gattii</i> WM779 cultivada em MM _L durante cinco dias evidenciando a formação de células irregulares características de pseudo-hifas (A); Curva de crescimento, em meio MM _L , MM _L (0%GLICINA), MM _L (0%MAGNÉSIO), MM _L (0%POTÁSSIO), MM _L (0%POTÁSSIO E MAGNÉSIO) a 37°C para as linhagens de <i>C. gattii</i> WM779 e <i>Cryptococcus neoformans</i> H99 (B); Curva de crescimento, em meio MM _L , MM _L (50%GLICOSE), MM _L (25%GLICOSE), MM _L (12,5%GLICOSE), MM _L (0%GLICOSE) a 37°C para as linhagens de <i>C. gattii</i> WM779 e <i>Cryptococcus neoformans</i> H99 (C); Preparações de nanquim da linhagem de <i>C. gattii</i> WM779 e cultivadas em MM _L , MM _L (50%GLICOSE), MM _L (25%GLICOSE), MM _L (12,5%GLICOSE), MM _L (0%GLICOSE) durante cinco dias comparada a <i>C. neoformans</i> H99 cultivado no mesmo tempo e condição de cultivo (D). Representação esquemática da transição	

morfológica de *Cryptococcus* de levedura para hifa, evidenciando as possíveis variações morfológicas que podem ocorrer durante essa transição, as mesmas observadas para a linhagem WM779 quando crescida no MM_L (50% GLICOSE); as setas tracejadas indicam para uma morfologia da qual não observamos, mas, que pode ocorrer. SC: Sem crescimento.....48

Figura 10. Caracterização do fenótipo de melanização e quantificação das enzimas lacase e urease. Fenótipo de melanização em MM_s suplementado com L-dopa, após 7 dias de incubação a 37°C (A). Quantificação da enzima lacase em MM_L após 72 horas (B). Atividade da enzima urease, as células foram incubadas em Roberts ureia broth; após 4 horas de incubação, a densidade óptica do sobrenadante foi mensurada a 600 nm (C).....50

Figura 11. Caracterização da virulência em modelo murino de infecção, para as diferentes linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans*. Curva de letalidade em modelo murino C57, após infecção intratraqueal com inóculo de 1×10^5 cels/30µL de *C. gattii* (A) e *C. neoformans* (B). Gráfico exemplo para análise dos diferentes parâmetros neurológicos avaliados no protocolo SHIRPA e sua influência nos perfis de virulência encontrados para cada linhagem (C). Área Sob a curva dos domínios tônus e força muscular (D), Estado neuropsiquiátrico (E), Comportamento motor (F), Função e reflexo sensorial (G) e Função autônoma (H).....52

Figura 12. Avaliação da carga fúngica no lavado, pulmão, baço e cérebro para as diferentes linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans* após 10 dias de infecção intratraqueal. Determinação de UFC/mL no lavado (A) e UFC/g no pulmão (B), baço (C) e cérebro (D) após 10 dias de infecção.....54

Figura 13. Determinação da morfologia no lavado (A), (B) e (C) e pulmão (D), (E) e (F) para as linhagens de *C. gattii* (WM779, R265, WM179 e WM161) representadas em branco e *Cryptococcus neoformans* (H99, WM628, WM148, WM626) representadas em azul, após 6, 24 e 240 horas de infecção. Cinética da carga fúngica no cérebro para as linhagens de *C. gattii* (G) e *C. neoformans* (H) após 6, 24 horas e 10 dias.....58

Figura 14. Morfologia de *Cryptococcus* na perspectiva do ambiente, laboratório e hospedeiro. MM: Meio mínimo; MM+SFB10%: Meio mínimo suplementado com soro fetal bovino 10%, SD: Sabouraud dextrose; EC_{LBA}: Espessura capsular de leveduras derivadas do lavado broncoalveolar; EC_P: Espessura capsular de leveduras derivadas do pulmão; EC/R_{LBA}: Proporção da cápsula no lavado broncoalveolar em relação ao tamanho do corpo celular, EC/R_P: Proporção da cápsula no pulmão em relação ao tamanho do corpo celular. Os símbolos de interrogação representam os contextos em que a morfologia das linhagens desse estudo ainda será analisada.....71

Tabela 1: Taxonomia clássica para espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus*.....12

Tabela 2: Nova classificação proposta para espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus*.....13

Tabela 3: Variação fenotípica conforme o genótipo de *C. gattii*.....14

Tabela 4: Relação das linhagens de <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i> que foram utilizadas neste estudo	28
Tabela 5: Resumo dos parâmetros avaliados pelo protocolo SHIRPA.....	38
Tabela 6: Concentração inibitória mínima (CIM - µg/mL) de anfotericina B, fluconazol e itraconazol frente a cinco linhagens de <i>C. gattii</i> e cinco de <i>C. neoformans</i>	38
Tabela 7: Variação da espessura capsular das linhagens de <i>C. gattii</i> de acordo com as condições experimentais <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> ; e perfil de letalidade em modelo murinho de infecção intratraqueal.....	61
Tabela 8: Variação da espessura capsular das linhagens de <i>C. neoformans</i> de acordo com as condições experimentais <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> ; e perfil de letalidade em modelo murino de infecção intratraqueal.....	62

SUMÁRIO

RESUMO	iii
ABSTRACT	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	ix
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Revisão de literatura	14
1.1.1 <i>Cryptococcus</i> spp. e a Criptococose.....	14
1.1.3 Fatores de virulência	19
1.1.3.1 Cápsula polissacarídica	20
1.1.3.2 Melanização.....	21
1.1.3.3 Termotolerância.....	22
1.1.3.4 Produção de enzimas	22
1.1.4 Criptococose.....	24
1.1.4.1 Patogênese	24
1.1.4.2 Epidemiologia.....	26
1.1.4.3 Tratamento.....	28
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
4. METODOLOGIA.....	33
4.1 Microrganismos	33
4.2 Antifúngicos	33
4.3 Experimentação <i>in vitro</i>	34
4.3.1 Avaliação da susceptibilidade aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e itraconazol.	34
4.3.1.1 Diluição dos antifúngicos	34
4.3.1.2 Preparo do inóculo.....	35
4.3.1.3 Leitura e interpretação dos resultados da CIM.....	35
4.3.2 Análise morfológica.....	36
4.3.3 Indução de melanização	36
4.3.4 Avaliação da atividade da enzima lacase	37
4.3.5 Avaliação da atividade da enzima urease.....	37
4.3.6 Curva de crescimento de <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i>	38
4.4 Experimentação <i>in vivo</i>	38

4.4.1 Avaliação da sobrevivência em modelo murino de infecção por <i>Cryptococcus gattii</i> ou <i>C. neoformans</i>	38
4.4.2 Avaliação comportamental dos animais infectados com <i>C. gattii</i> ou <i>C. neoformans</i> – Protocolo SHIRPA	39
4.4.3 Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC)	40
4.4.4 Cinética da infecção para avaliação das alterações morfológicas de <i>Cryptococcus in vivo</i> e sua influência na letalidade e transmigração para o sistema nervoso central	41
4.5 Análise estatística	41
5. RESULTADOS	42
5.1.1 Avaliação da susceptibilidade de <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i> ao fluconazol, a anfotericina B e ao itraconazol	42
5.1.2 Fatores de virulência	43
5.1.2.1 Determinação do perfil de crescimento de <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i> em diferentes condições nutricionais e de temperatura	43
5.1.2.2 Avaliação da morfologia de <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i> em diferentes condições nutricionais	47
5.1.4 Perfil de melanização e atividade das enzimas lacase e urease para <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i>	53
5.2 Caracterização da virulência em modelo animal	54
5.2.1 Perfil de letalidade em modelo murino	55
5.2.2 Determinação da carga fúngica em órgãos alvos	57
5.2.3 Alterações morfológicas de <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans in vivo</i>	59
5.2.3 Alterações na espessura capsular de <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i> : do <i>in vitro</i> ao <i>in vivo</i>	64
6. DISCUSSÃO	68
7. CONCLUSÃO	78
8 REFERÊNCIAS	79
9. ANEXO:	94

1. INTRODUÇÃO

1.1 Revisão de literatura

1.1.1 *Cryptococcus* spp. e a Criptococose

Os patógenos fúngicos apresentam relevante importância na vida vegetal e animal, estudos recentes apontam que mais de 300 milhões de pessoas são afetadas anualmente em todo o mundo por infecções fúngicas (Brown *et al.*, 2012; Tuite e Lacey, 2013; Mor *et al.*, 2015). Esse contexto está principalmente associado ao aumento da expectativa de vida, procedimentos médicos invasivos e o crescente número de indivíduos imunossuprimidos (Morris, 2014). Em destaque, as micoses invasivas normalmente estão associadas a casos mais graves e apresentam taxas de mortalidade superiores a 50% (Brown *et al.*, 2012). No entanto, apesar disso, as infecções fúngicas normalmente são negligenciadas, caracterizadas pela ausência de programas de vigilância em saúde e ambiental e pelo baixo financiamento em pesquisa quando comparada a outras doenças infecciosas (Brown *et al.*, 2012; Rodrigues, 2016).

A criptococose, infecção fúngica causada por leveduras encapsuladas do gênero *Cryptococcus*, se tornou ao longo dos anos a principal micose invasiva no mundo, com elevada prevalência e mortalidade (Park *et al.*, 2009; Pappas, 2013; Maziarz e Perfect, 2016). Sua etiologia está principalmente relacionada a duas espécies de *Cryptococcus*, *C. neoformans* e *C. gattii*, responsáveis por causar doenças em humanos e animais (Voelz e May, 2010; Cogliati, 2013; Mortenson *et al.*, 2013). A doença se caracteriza principalmente pelo acometimento primário dos pulmões e subsequentemente do cérebro. As manifestações clínicas variam de assintomática, quando o fungo permanece latente no hospedeiro; até pneumonia, meningoencefalite e manifestações secundárias decorrentes da disseminação do fungo para demais órgãos (May *et al.*, 2016; Maziarz e Perfect, 2016).

Cryptococcus é um gênero de fungos pertencente ao grupo Basidiomycota, ao subfilo Agaricomycotina, à classe Tremellomycetes e à família Tremellaceae da ordem Tremellales (Taxonomy, NCBI). Atualmente, esse gênero possui mais de 80 espécies, sendo que *C. neoformans* e *C. gattii* destacam-se por sua importância médica e veterinária (Fell *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2014) enquanto as demais como *C. albidus*, *C. laurentii* e *C. curvatus* se apresentam como leveduras saprofitas, apesar de serem frequentemente isoladas em amostras de pacientes imunocomprometidos (Li e Mody,

2010). Esse complexo é composto por células leveduriformes esféricas ou globosas envoltas por uma cápsula polissacarídica. Diferenças estruturais do polissacarídeo capsular glucuronoxilmanana (GXM), que constitui cerca de 90% da cápsula, permite a classificação do complexo *C. neoformans*/*C. gattii* em cinco sorotipos (A, B, C, D e AD) (Hagen *et al.*, 2015).

Durante o ciclo de vida, os microrganismos desse gênero apresentam duas formas de reprodução, assexuada ou sexuada. Na forma assexuada, variedade anamórfica, *C. gattii* e *C. neoformans* se dividem principalmente por brotamento. Enquanto na forma sexuada, variedade teleomórfica, esses dois microrganismos correspondem a *Filobasidiella neoformans* e *F. bacillispora*, respectivamente (Barnett, 2010). Nessa forma, no entanto, a reprodução ocorre por meio de um sistema de acasalamento bipolar, denominado *mating type* (MAT): α e a , em que as células leveduriformes sofrem um dimorfismo para o crescimento de hifas e consequente formação de basidiósporos (Chen *et al.*, 2014) considerados importantes propágulos infecciosos. Essa forma de reprodução está associada a recombinações gênicas, que ocasionalmente, podem levar ao surgimento de novas linhagens, contribuindo para o aumento da diversidade do gênero *Cryptococcus* (May *et al.*, 2016).

Quanto à morfologia, *C. gattii* e *C. neoformans*, variam suas formas entre leveduras e hifas, além de pseudohifas (Figura 1)(Antinori *et al.*, 2016). Essa variação morfológica, no entanto, está relacionada aos diferentes nichos ecológicos em que esses microrganismos são encontrados. Estudos com amebas, por exemplo, demonstraram que, na presença desse protozoário, as leveduras podem formar pseudofilamentos, o que evita a sua fagocitose (Steenbergen *et al.*, 2001). Além disso, já foram encontradas hifas e pseudohifas de *C. neoformans* em tecidos infectados de pacientes com criptococose (Williamson *et al.*, 1996; Gazzoni *et al.*, 2010). Entretanto, a morfologia de *Cryptococcus* pode variar conforme exposição a pressões ambientais e do hospedeiro.

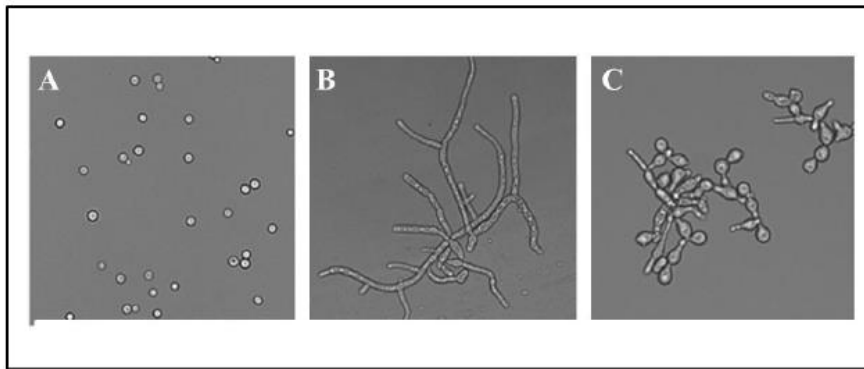


Figura 4. Variação morfológica de *Cryptococcus* spp.

No ambiente esses microrganismos residem em diversos nichos ecológicos (Figura 2); tanto *C. neoformans* quanto *C. gattii* podem ser encontrados em matéria orgânica em decomposição como frutas, madeira e fezes de aves. *C. neoformans* é conhecido por sua distribuição global, enquanto *C. gattii* foi classicamente visto como um fungo de clima tropical e subtropical (Steenbergen e Casadevall, 2003; Chowdhary *et al.*, 2012; Springer *et al.*, 2014). No entanto, evidências mais recentes encontraram reservatórios de *C. gattii* no norte dos EUA, Canadá e norte europeu, indicando que esta espécie também pode ter um ambiente ecológico mais amplo do que era conhecido anteriormente (Kidd *et al.*, 2004; Harris *et al.*, 2011; Phillips *et al.*, 2015; May *et al.*, 2016). *C. neoformans* é particularmente abundante em excreta de aves e sua associação com pombos selvagens poderia ser uma importante fonte de infecção em zonas urbanas densamente povoadas (Ngamskulrunroj *et al.*, 2009). Além disso, tanto *C. neoformans* quanto *C. gattii* podem sobreviver e crescer em amebas de vida livre no solo e nematoides (Steenbergen *et al.*, 2001; Steenbergen e Casadevall, 2003; Coelho *et al.*, 2014). Contudo, por não necessitar de animais para completar o seu ciclo de vida, acredita-se que a infecção por *Cryptococcus* spp. ocorra de forma acidental, e que as interações com diferentes nichos ecológicos tem um papel importante no desenvolvimento de fatores de virulência que favorecem para a patogênese desse microrganismo em mamíferos (Casadevall *et al.*, 2003).

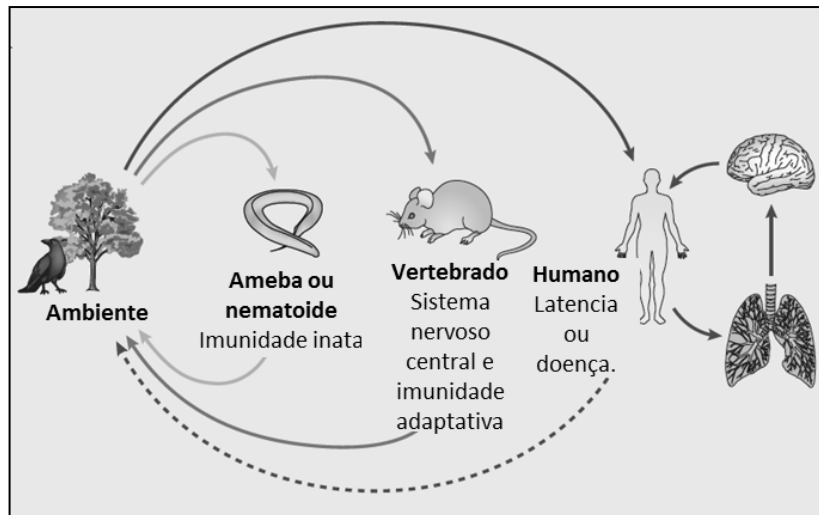


Figura 5. Diversidade de nichos ecológicos de *Cryptococcus* spp. (Fonte – Adaptado (May *et al.*, 2016))

1.1.2 Taxonomia de *C. gattii* e *C. neoformans*

As duas principais espécies de importância médica e veterinária do gênero *Cryptococcus*, *C. gattii* e *C. neoformans*, se divergiram de um ancestral comum há cerca de 30 a 40 milhões de anos (Xu *et al.*, 2000; Findley *et al.*, 2009). *C. neoformans* possui origens evolutivas comuns na África Subsaariana, enquanto, *C. gattii*, teria origens na Austrália e América do Sul (Litvintseva *et al.*, 2007; Litvintseva *et al.*, 2011; Litvintseva e Mitchell, 2012). Acredita-se que as migrações humanas e aviárias tenham tido um papel importante na dispersão desses patógenos no globo terrestre, e que para *C. neoformans* esses eventos evolutivos de dispersão tenham ocorrido nos últimos 5.000 anos e para *C. gattii* nos últimos 50.000 anos (Litvintseva *et al.*, 2011; Billmyre *et al.*, 2014; Engelthaler *et al.*, 2014; May *et al.*, 2016). No entanto, esses eventos, contribuem para a ocorrência de recombinações gênicas contínuas, que ocasionalmente, podem levar a origem de novas linhagens, que rapidamente se dispersam e se expandem no ambiente (Fraser *et al.*, 2005; Hagen *et al.*, 2013). Assim, a dispersão evolutiva reflete a diversidade filogenética do complexo *C. neoformans/ C. gattii*, influenciando a adaptação e virulência desses microrganismos durante as interações com o ambiente e com o hospedeiro (May *et al.*, 2016). Além disso, podem contribuir para a necessidade de modificações taxonômicas que corroborem com a real biodiversidade encontrada no gênero.

Classicamente, *C. gattii* e *C. neoformans*, foram divididas em três variedades, cinco sorotipos e oito subtipos moleculares (Tabela 1). Essa distinção foi realizada

baseada na diversidade filogenética observada entre as espécies e na diferença antigênica induzida pela cápsula polissacarídica. Entretanto, *C. gattii* era considerado uma variedade do complexo *C. neoformans* (*C. neoformans* var. *gattii*) porém, em 2002, após ter sido responsável por um surto de infecções em indivíduos hígidos na América do Norte, foi reconhecido como uma espécie distinta de *C. neoformans* (Byrnes *et al.*, 2011; Kronstad *et al.*, 2011; Engelthaler *et al.*, 2014). Com base em dados de filogenia, fenotipagem e tipagem genética, foi observado que a variedade *gattii* constitui um grupo monofilético distinto da variedade *neoformans*, justificando o reconhecimento da var. *gattii* como uma espécie (KWON-CHUNG *et al.*, 2002). Além disso, análises filogenéticas sugerem que *C. gattii* diverge de *C. neoformans* em aproximadamente 37 milhões de anos e que a variedade *grubii* e a variedade *neoformans* divergem entre si em aproximadamente 19 milhões de anos (XU; VILGALYS; MITCHELL, 2000; MARRA *et al.*, 2004).

Tabela 1: Taxonomia clássica para espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus* (Kwon-Chung *et al.*, 2002).

Sorotipo	Espécies e variedade	Tipo molecular
A	<i>C. neoformans</i> var. <i>Grubii</i>	VN I, VN II
B	<i>C. gattii</i>	VG I, VG II, VG III e VG IV
C	<i>C. gattii</i>	VG I, VG II, VG III e VG IV
D	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	VN IV
AD	<i>C. neoformans</i>	VN III

Nos últimos anos, estudos demonstraram evidências desfavoráveis a classificação do complexo *C. neoformans/C. gattii* em apenas duas espécies (Bovers *et al.*, 2008; Ngamskulrungrroj *et al.*, 2009; Hagen *et al.*, 2015). Baseado em análises genealógicas e de coalescência, Hagen e colaboradores (2015), demonstraram que a classificação do complexo *C. neoformans/C. gattii* não reflete nas relações filogenéticas observadas dentro do grupo, que linhagens mais distintas existem dentro desse complexo e que as mesmas poderiam representar novas espécies. Com isso, os autores propuseram a polêmica divisão do complexo em sete espécies haploides (Tabela 2). Nessa nova classificação, *C. neoformans* seria dividido em duas espécies (*C. neoformans* e *C. deneoformans*) e *C. gattii* em cinco novas espécies (*C. gattii*, *C. deuterogattii*, *C. bacillisporus*, *C. tetragattii* e *C. decagattii*). Porém, alguns autores renomados consideram essa classificação precoce, tendo em vista o número limitado de linhagens que foram utilizadas no estudo, a possível instabilidade taxonômica que poderá ocorrer

para os agentes da criptococose e a eminente ocorrência de desconexão dos dados epidemiológicos e clínicos que foram realizados baseados na taxonomia clássica. Entretanto, essa nova classificação, ainda não tem sido muito bem aceita e a divisão defendida por Kwon-Chung e colaboradores (2002) em duas espécies tem prevalecido (Kwon-Chung et al., 2002).

Tabela 2: Nova classificação proposta para espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus* (Hagen et al., 2015).

Nome da espécie atualmente	Genótipo	Nova nomenclatura proposta
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	VN I, VN II, VN III	<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	VN IV	<i>Cryptococcus deneoformans</i>
<i>C. gattii</i>	VG I	<i>Cryptococcus gattii</i>
<i>C. gattii</i>	VG II	<i>Cryptococcus deuterogattii</i>
<i>C. gattii</i>	VG III	<i>Cryptococcus bacillisporus</i>
<i>C. gattii</i>	VG IV	<i>Cryptococcus tetragattii</i>
<i>C. gattii</i>	VG IV/VGIIIc	<i>Cryptococcus decagattii</i>

1.1.3 Fatores de virulência

Durante a infecção, *C. gattii* e *C. neoformans*, utilizam estratégias que permitem a resistência a fagocitose, invasão tecidual, proliferação no interior de fagócitos e consequentemente favorecem para a disseminação hematogênica, levando ao comprometimento de outros órgãos, tais como baço, fígado e principalmente o cérebro (Nara et al., 2008; Krockenberger et al., 2010; Matsuda et al., 2011). Essas estratégias são conhecidas como fatores de virulência, que além de contribuírem para o sucesso da infecção no hospedeiro também influenciam na capacidade de sobrevivência desses microrganismos as pressões ambientais (May et al., 2016). No entanto, acredita-se que os fatores de virulência, tais como melanização, termotolerância, produção de cápsula e produção de enzimas foram selecionados ao longo da evolução por meio da interação entre o fungo e o ambiente e/ou predadores naturais e tem um papel dual na sobrevivência desse microrganismo (Casadevall et al., 2003; Steenbergen e Casadevall, 2003; Lin et al., 2015; May et al., 2016). Além disso, já foi observado que linhagens do complexo *C.gattii*, podem apresentar diferenças em alguns fatores de virulência conforme a sua variação molecular (Tabela 3)(Fernandes et al., 2016).

Tabela 3: Variação fenotípica conforme o genótipo de *C. gattii*. (Adaptado – Fernandes *et al.*, 2016)

Característica fenotípica	Valor por espécie/genótipo			
	VGI (n=19)	VGII (n=19)	VGIII (n=14)	VGIV (n=18)
Diâmetro da célula	7,0 *(0,9)	8,4 (2,5)	6,6 (1,0)	7,1 (1,8)
Espessura da cápsula (µm)	6,1 (3,3)	2,6 (0,5)	3,2 (2,7)	4,4 (2,0)
Termotolerância	Intermediária	Alta	Baixa	Baixa
Tolerância ao estresse oxidativo	Alta	Alta	Alta	Alta

*Desvio padrão entre parenteses

1.1.3.1 Cápsula polissacarídica

A cápsula polissacarídica tem um papel crucial nas interações de *Cryptococcus* no ambiente e com o hospedeiro. Sua estrutura bioquímica é composta principalmente pelo polissacarídeo glicuronoxilomanana 90-95% (GXM) e em pequeno percentual, 5%, por galactoxilomanana (GalXM) (Ma e May, 2009; Kronstad *et al.*, 2011). A mesma confere proteção a dessecação ambiental e fagocitose por amebas, além de, durante a infecção do hospedeiro, contribuir para resistência a fagocitose, ao estresse oxidativo e modulação da resposta imune (Prates *et al.*, 2013). Trata-se de uma estrutura tão importante, que a sua ausência está associada a redução na virulência de *Cryptococcus* e consequentemente, incapacidade de causar doença em modelo murino. Já foi demonstrado, por exemplo, que mutantes acapsulares de *Cryptococcus* são incapazes de proliferar no interior de fagócitos, confirmando o papel fundamental dessa estrutura na sobrevivência e proliferação intracelular. Durante a fagocitose, a cápsula confere resistência ao estresse oxidativo e induz o acúmulo de vesículas de GXM que alteram a funcionalidade do fagócito e levam a apoptose. Além disso, a cápsula polissacarídica também está associada a menor sensibilidade a antifúngicos, como anfotericina B e indiretamente, contribui na transmigração de *Cryptococcus* para o SNC, uma vez que, a mesma possui ácido hialurônico, substância que facilita a passagem pela barreira hematoencefálica. (Frasas *et al.*, 2008; Zaragoza *et al.*, 2008; Fonseca *et al.*, 2010; Li e Mody, 2010).

A síntese dessa estrutura é um processo extremamente regulado que ocorre frente a situações de estresse, tais como: elevados níveis de CO₂, aumento do pH e redução de íons; ou de carência nutricional. No entanto, a regulação da produção de cápsula parece ocorrer de forma diferente entre as espécies de *C. gattii*. Evidências

recentes apontam que linhagens do tipo VGI produzem mais cápsula quando comparadas aos genótipos VGII, VGIII e VGIV, sugerindo maior capacidade adaptativa desse genótipo no ambiente e conseqüentemente maior virulência (Fernandes *et al.*, 2016). Porém, existem outros mecanismos adaptativos, como alterações morfológicas, melanização, produção de enzimas antioxidativas que podem compensar a menor produção de cápsula (Casadevall *et al.*, 2003; Frases *et al.*, 2008; Ma e May, 2009). As linhagens de genótipo VGII, por exemplo, apesar de produzirem menos cápsula em relação a VGI, apresentam diâmetro significativamente maior; fator que também pode dificultar a fagocitose no início da infecção (Fernandes *et al.*, 2016). Além disso, sugere-se que a relação entre o tamanho da cápsula e a virulência varie no decorrer da infecção. Assim, células com maior cápsula podem ser favorecidas no início da infecção pela capacidade antifagocítica, mas em contrapartida, células menos cápsuladas podem disseminar dos pulmões e atravessar a barreira hematoencefálica mais facilmente (Rivera *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 2010; Long *et al.*, 2012).

1.1.3.2 Melanização

A produção de melanina é um mecanismo de virulência de *Cryptococcus*, descoberto por Staib em 1960. Trata-se de um pigmento hidrofóbico de elevado peso molecular que é formada pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos (Williamson, 1997; Casadevall *et al.*, 2000). Em *Cryptococcus* spp., essa polimerização oxidativa é mediada pela enzima lacase, que utiliza catecolaminas como substratos para a biossíntese desse pigmento. (Williamson, 1997; Nosanchuk *et al.*, 2001; Kronstad *et al.*, 2011; Sabiiti e May, 2012). A melanina produzida se acumula na parede da célula e está envolvida nos processos de absorção e dissipação de várias formas de energia, ligação de antifúngicos e resistência ao estresse oxidativo (Nosanchuk *et al.*, 2001). Um estudo clássico, também demonstrou que células melanizadas quando comparadas com as não melanizadas, são menos sensíveis a substâncias oxidantes e a drogas antifúngicas, como: anfotericina B e caspofungina, confirmando a relação entre a produção de melanina e aumento da virulência de *Cryptococcus*. (Van Duin *et al.*, 2002; Franco-Paredes *et al.*, 2015). No ambiente, a produção desse pigmento confere as leveduras proteção contra a ação da luz UV e a temperaturas elevadas (Ma e May, 2009).

1.1.3.3 Termotolerância

A capacidade de tolerar temperaturas fisiológicas é essencial para a virulência de *C. neoformans* e *C. gattii*, possibilitando a ocorrência da infecção em mamíferos (Kronstad *et al.*, 2011; Franco-Paredes *et al.*, 2015). Embora algumas espécies de *Cryptococcus* sejam capazes de produzir melanina e cápsula, a incapacidade de crescer a 37°C impede que essas espécies causem doença em mamíferos (Ma e May, 2009). Dessa forma, a restrição de temperatura é um determinante na patogenicidade de *Cryptococcus* spp.

A tolerância a temperatura fisiológica humana está relacionada a produção de calcineurina, uma proteína fosfatase dependente de cálcio (Odom *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2012). No entanto, já foi observado que *C. gattii*/VG II possui maior termotolerância, em relação aos outros genótipos do complexo *C. gattii*, esse fator pode ser explicado pelo fato das linhagens desse genótipo apresentarem maior tolerância aos inibidores de calcineurina (Fernandes *et al.*, 2016).

1.1.3.4 Produção de enzimas

A produção de enzimas é crucial para a patogênese fúngica e pode interferir no percurso da infecção. *C. neoformans* e *C. gattii* liberam uma série de lipases, DNAses e proteases que atuam na destruição de tecidos e contribuem na capacidade de sobrevivência desses microrganismos no decorrer da infecção, invasão tecidual e interfere na resposta imunológica (Almeida *et al.*, 2015).

As DNAses são produzidas em elevadas quantidades por *C. neoformans* e podem degradar o DNA do hospedeiro secretado por neutrófilos relacionados a resposta imune inata e ainda, podem fornecer nucleotídeos para *C. neoformans* (Cazin *et al.*, 1969; Rocha *et al.*, 2015). No entanto, já foi observado que, a produção de DNAses ocorre de forma mais acentuada em isolados clínicos em relação as linhagens ambientais, sugerindo a importância da enzima na virulência de *Cryptococcus* (Sánchez e Colom, 2010).

As superóxidos dismutases (SODs) são enzimas produzidas por *C. neoformans* e que convertem o superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio (Fridovich, 1995; Almeida *et al.*, 2015). Essa conversão, facilita a sobrevivência e o crescimento no

interior de macrófagos, através de um mecanismo que envolve a proteção do fungo contra o superóxido gerado pela resposta imune do hospedeiro (Hamilton e Holdom, 1997; Cox *et al.*, 2003). A produção de SOD é regulada pela temperatura, sendo mais evidenciada à 37°C em relação a temperatura de 25°C. Assim, o aumento da produção de SOD às temperaturas corporais pode proteger o fungo contra agentes oxidantes produzidos a partir de células de defesa do hospedeiro (Jacobson *et al.*, 1994).

Para *Cryptococcus neoformans* já foram descritas várias fosfolipases, tais como a fosfolipase B, C, lisofosfolipase e aciltransferase. Em geral, as fosfolipases atuam degradando fosfolipídios de membrana, contribuindo para a invasão tecidual durante a infecção (Barrett-Bee *et al.*, 1985; Chen *et al.*, 1997; Henry *et al.*, 2011; Almeida *et al.*, 2015). A fosfolipase B, atua de diversas formas durante a infecção, promove a degradação de fosfolipídios do surfactante pulmonar e da membrana plasmática, mantém a integridade da parede fúngica e fornecem nutrientes que podem ser utilizados como fonte de carbono para *Cryptococcus neoformans* (Chen *et al.*, 2000; Siafakas *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2007). A fosfolipase C é crucial para vários fenótipos de virulência, como produção de melanina, crescimento a 37 ° C, secreção da fosfolipase B e resistência a drogas antifúngicas, além de estar envolvida na regulação da homeostase, divisão celular após a citocinese e manutenção da integridade da parede celular (Chayakulkeeree *et al.*, 2008; Lev *et al.*, 2013).

As proteases, outro tipo de enzima produzida por *Cryptococcus*, atuam na degradação de proteínas e dessa forma, contribuem para a invasão tecidual, colonização alteração da resposta imune do hospedeiro; sendo consideradas importante na virulência de *Cryptococcus neoformans* (Brueske, 1986; Pinti *et al.*, 2007).

A catalisação da ureia em amônia e carbamato, mecanismo de ação da urease, é um importante fator de virulência de *Cryptococcus*. Acredita-se que tal mecanismo é importante para propiciar a invasão do SNC (Ma e May, 2009; Kronstad *et al.*, 2011). A produção dessa enzima varia entre os isolados clínicos, sendo observada algum nível de atividade da mesma na maioria (99,6%) dos isolados (Bava *et al.*, 1993; Almeida *et al.*, 2015).

1.1.4 Criptococose

1.1.4.1 Patogênese

A criptococose é uma micose invasiva que ocorre pela inalação de leveduras dessecadas do ambiente ou basidiósporos dispersos no ar, que são transportados das vias aéreas superiores, de uma fonte ambiental para os pulmões. Esses propágulos infecciosos são pequenos, de 1,5 a 3,5 μ m (leveduras) e de 1,0 a 2,0 μ m (basidiósporos), tamanho ideal para se instalarem rapidamente nos alvéolos pulmonares e serem prontamente reconhecidos por macrófagos alveolares (Datta *et al.*, 2009; Gibson e Johnston, 2015). Após a ativação desses macrófagos alveolares, ocorre o recrutamento de outras células imunes pela indução de citocinas e quimiocinas, levando a uma resposta pró-inflamatória e granulomatosa (Olszewski *et al.*, 2010; Kwon-Chung *et al.*, 2014; Gibson e Johnston, 2015). No entanto, devido a sua característica evolutiva de exposição a amebas ambientais, o *Cryptococcus* adquiriu estratégias adaptativas que conferem capacidade de sobrevivência no interior de fagócitos (Steenbergen *et al.*, 2001; Steenbergen e Casadevall, 2003; Coelho *et al.*, 2014). Com isso, vários fatores de virulência como produção de cápsula, melanização e termotolerância se combinam no início da infecção para proteger o fungo da fagocitose, neutralizando o pH e as espécies reativas de oxigênio, permitindo que ele sobreviva e prolifere no interior dos macrófagos (Coelho *et al.*, 2014). Mais recentemente foi descrito outro mecanismo relacionado ao escape de *Cryptococcus* da fagocitose, denominado vomocitose ou extrusão (Nicola *et al.*, 2011). Nessa estratégia, ocorre a indução da fusão do fagossoma com a membrana citoplasmática, culminando com a expulsão dos fungos do interior do fagócito (Alvarez e Casadevall, 2007). Esse processo também pode estar envolvido na transferência lateral de *Cryptococcus* spp. de uma célula para a outra no hospedeiro durante a infecção, porém os processos que ocorrem após esses eventos ainda permanecem desconhecidos (May *et al.*, 2016).

Frente ao escape da resposta do hospedeiro, ocorre inicialmente uma colonização dos pulmões por *Cryptococcus*, resultando na instalação da infecção. Essa colonização inicial é frequentemente assintomática ou apresenta-se como sintomas gripais, como tosse e febre, podendo evoluir para sintomas mais severos como pneumonia e a síndrome aguda do estresse respiratório (Maziarz e Perfect, 2016). O fungo pode permanecer em estado de dormência, provavelmente dentro de linfonodos, e em condições de imunossupressão causar doença (Ma e May, 2009).

Uma vez que *Cryptococcus* escapa da defesa do hospedeiro no pulmão e consegue se proliferar, ele se dissemina via hematogênica, atingindo outros órgãos tais como baço (Krockenberger *et al.*, 2010), fígado (Nara *et al.*, 2008), supra-renais (Matsuda *et al.*, 2011) e principalmente o cérebro (Chrétien *et al.*, 2002). O tropismo pelo cérebro estaria relacionado ao fato desse órgão apresentar elevados níveis de catecolaminas, substrato percussor da síntese de melanina (Mednick *et al.*, 2005).

Conhecidamente, *C. neoformans* e *C. gattii*, são capazes de ultrapassar a barreira hemato-encefálica se disseminando para o parênquima cerebral, o que ocasiona o quadro da meningoencefalite, principal manifestação clínica característica da infecção e responsável por morte na maioria dos casos. O mecanismo pelo qual o fungo executa esse deslocamento é explicado por três hipóteses bastante discutidas. O primeiro mecanismo é o de paracitose, no qual a célula fúngica ultrapassa a barreira hematoencefálica permeando entre as junções das células endoteliais, usando proteases como Mpr1, que permitem essa migração transendotelial (Vu *et al.*, 2014). O segundo mecanismo se configura como "cavalo de Tróia", abordagem na qual as células fúngicas ganham acesso ao cérebro por meio do transporte em células fagocíticas, sugerindo que a invasão do cérebro seja célula-associado (Chrétien *et al.*, 2002; Charlier *et al.*, 2009). O terceiro mecanismo é o de transcitose, no qual a célula fúngica é capaz de cruzar a barreira endotelial por si mesmo, atravessando o citoplasma da célula endotelial atingindo subsequentemente o parênquima cerebral (Chang *et al.*, 2004). Nesse mecanismo, o ácido hialurônico situado na superfície da célula criptocócica se liga ao CD44 no endotélio luminal, anexando o fungo à célula hospedeira (Jong *et al.*, 2008). Esta ligação, em seguida, induz a remodelação de actina dependente de proteína C-dependente na célula hospedeira, levando-a a fagocitar a célula fúngica. Curiosamente, altos níveis de inositol presentes no cérebro atuam como um gatilho para este processo, aumentando a expressão do ácido hialurônico pelo fungo (Liu *et al.*, 2013).

Assim, pacientes com meningite criptocócica (MG) apresentam sintomas predominantemente neurológicos, mais tipicamente cefaleia e estado mental alterado, bem como febre, náuseas e vômitos. A duração média desde o início dos sintomas até a manifestação clínica é de duas semanas em pacientes com infecção por HIV e 6-12 semanas em casos de pacientes HIV negativos. Muitos pacientes desenvolvem alterações oftalmológicas, como a diplopia e, posteriormente, secundária à alta pressão do líquido céfalo-raquidiano ou envolvimento do nervo e trato óptico, ocorre redução da

acuidade visual (Moodley *et al.*, 2012). Sem tratamento, a doença progride e os sintomas se estendem a confusão mental, convulsões, nível reduzido de consciência e eventualmente coma e morte (Williamson *et al.*, 2017).

1.1.4.2 Epidemiologia

A criptococose causada por *C. neoformans* é mundialmente distribuída e a grande maioria dos casos de infecção disseminada sintomática estão associadas a alguma condição de imunossupressão prévia (Perfect *et al.*, 2010; Kwon-Chung *et al.*, 2014). A infecção por HIV é uma das principais condições que predispõe a meningite criptococócica. Apesar de apresentar distribuição mundial, a maioria dos casos de criptococose ocorre na África Subsaariana, onde mais de 25 milhões de pessoas vivem com AIDS (Park *et al.*, 2009). Outras condições prévias que levem a algum comprometimento imunológico também podem contribuir para a infecção por *Cryptococcus*, como uso prolongado de corticosteroides, pacientes transplantados, sarcomas, neutropenia e diabetes (Perfect *et al.*, 2010). Embora frequentemente a doença disseminada ocorra em pacientes imunossuprimidos, *C. neoformans* também pode causar doença em indivíduos aparentemente imunocompetentes, porém, nesse caso, a infecção é predominantemente causada por *C. gattii* (Sorrel *et al.*, 2011). Estudos recentes demonstraram que pacientes aparentemente hígidos podem apresentar alguma disfunção imunológica prévia que não é detectada por testes laboratoriais normalmente realizados, levando a falsa impressão de imunocompetência em pacientes infectados por *Cryptococcus*. Já foi observado, por exemplo, auto-anticorpos neutralizantes para Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (FEC-GM) no plasma de pacientes aparentemente hígidos infectados por *C. gattii*, sugerindo que testes imunológicos mais específicos podem revelar condições prévias em pacientes aparentemente hígidos que favoreçam para a ocorrência da infecção (Saijo *et al.*, 2014).

A infecção por *C. gattii* (~20%) é significativamente menos frequente que *C. neoformans* (80%), e os principais fatores de risco para a infecção por *C. gattii* ainda permanecem pouco esclarecidos. Mas em estudos iniciais, a infecção por *C. gattii* apresentava prevalência parecida com *C. neoformans*, em regiões de clima tropical e subtropical, sendo menos frequente em regiões de clima temperado (Meyer *et al.*, 2011). Mas alguns estudos indicaram que a espécie apresentou expansão no seu nicho

ecológico para zonas temperadas ao longo dos anos (Kwon-Chung e Bennett, 1984a; b; Kwon-Chung *et al.*, 1992; Kwon-Chung *et al.*, 2014). Os surtos da infecção por *C. gattii* na Ilha de Vancouver no Canadá (Hoang *et al.*, 2004; Macdougall *et al.*, 2007) e nos Estados Unidos (Macdougall *et al.*, 2007; Byrnes, Bildfell, *et al.*, 2009; Byrnes e Heitman, 2009; Byrnes, Li, *et al.*, 2009) são bons exemplos dessa expansão ecológica. A importação de eucaliptos da Austrália, a taxa acelerada de viagens internacionais e mudanças climáticas são alguns fatores que podem ter contribuído, ao longo dos anos, para a expansão e adaptação de *C. gattii* para regiões de clima temperado (Kwon-Chung *et al.*, 2014).

A prevalência de *C. neoformans* e *C. gattii* em processos infecciosos apresenta variações epidemiológicas de acordo com o genótipo envolvido. Isolados de *C. neoformans* do tipo molecular VNI (63%) são os mais prevalentes agentes da criptococose em todo o mundo, seguido pelo genótipo VNII / VNIII (6% cada) e VNIV (5%). Para *C. gattii* o tipo molecular VGI é o mais frequente (9%) seguido por VGII (7%), VGIII (3%) e VGIV (1%). Por outro lado, os tipos moleculares VGIII e VGIV são comumente observados como causadores de criptococose em pacientes imunocomprometidos na África e nos Estados Unidos (Byrnes *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2014). Além disso, nos países asiáticos, o genótipo VGI é o mais comumente observado (Chen *et al.*, 2014). Assim, essas classificações moleculares podem permitir uma melhor compreensão das diferenças epidemiológicas relacionadas a doença (**Figura 3**) (Krockenberger *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2014). Já foi observado para *C. gattii* que os fatores de virulência podem variar de acordo com genótipo, o que pode influenciar na prevalência desses agentes infecciosos como causadores de doença em humanos e outros animais (Fernandes *et al.*, 2016).

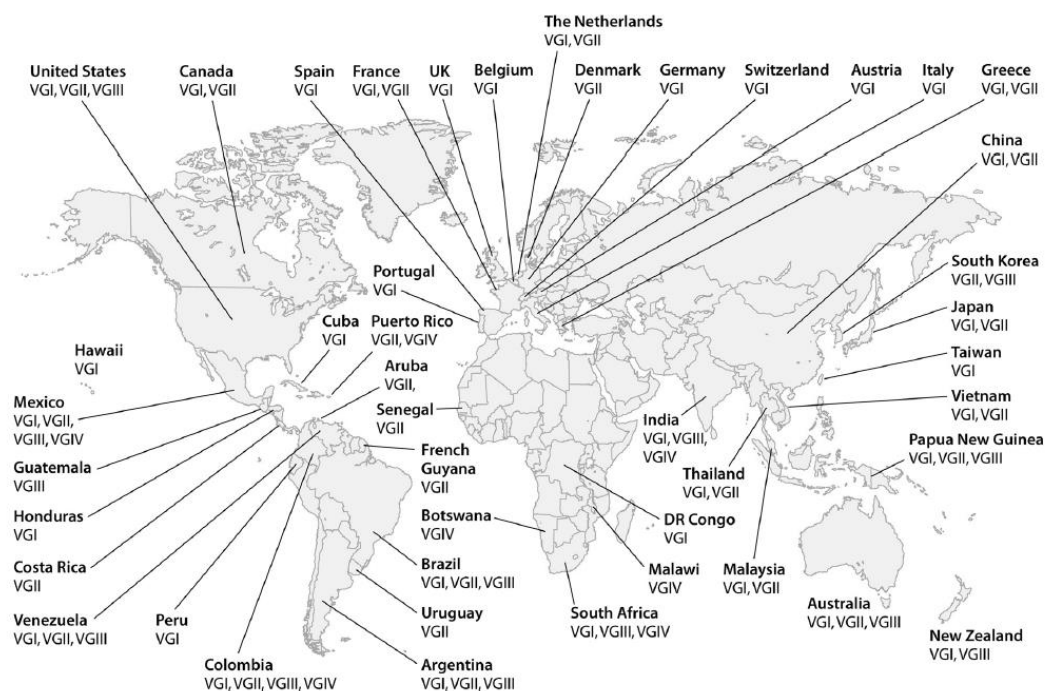


Figura 6. Distribuição global dos genótipos de *C. gattii*. (Fonte: Adaptado – Che et al, 2014).

No Brasil, espécies do gênero *Cryptococcus* spp. já foram isoladas em várias regiões geográficas, tais como Bahia, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Goiás, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (Leite *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014). O genótipo VGII ocorre com maior frequência nas regiões Norte e Nordeste do Brasil causando doença em adultos, jovens e crianças imunocompetentes (Da Silva *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014) enquanto o genótipo VGIII abrange 21% das amostras de *C. gattii* isolados a partir de eucaliptos no estado nas regiões sul e sudeste (Chen *et al.*, 2014).

1.1.4.3 Tratamento

As estratégias terapêuticas da Criptococose estão diretamente relacionadas ao local da infecção no hospedeiro, ao estado imunológico e a severidade dos sintomas (Perfect *et al.*, 2010; Coelho e Casadevall, 2016). Os antifúngicos normalmente utilizados, incluem a Anfotericina B, 5-flucitosina ou Fluconazol (Nooney *et al.*, 2005; Coelho e Casadevall, 2016). No entanto, esse cenário terapêutico vem se tornando limitado frente a resistência microbiana, estimulando estudos voltados para o desenvolvimento de novos antifúngicos, para o reposicionamento de fármacos ou até mesmo para otimizar o uso dos antifúngicos já existentes.

A anfotericina B pertence à classe dos polienos e vem sendo utilizada no tratamento da Criptococose desde o final da década de 1960 (Kwon-Chung *et al.*, 2014). Esse polieno possui um espectro de ação amplo e atua na membrana plasmática se ligando ao ergosterol e formando poros. A formação desses poros leva a um aumento na permeabilidade de cátions do meio extracelular, resultando na morte fúngica (Cannon *et al.*, 2009; Nett e Andes, 2016). Além disso, outros mecanismos de ação já foram descritos para a anfotericina B, a droga pode sofrer auto-oxidação e promover o aumento de radicais livres como espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. O acúmulo desses radicais livres ocasiona um estresse oxidativo e nitrosativo culminando a mais danos na célula fúngica (Ferreira *et al.*, 2013). Apesar do amplo espectro de ação e boa eficácia terapêutica, a anfotericina B está associada a danos hepáticos e renais o que muitas vezes limita a sua utilização (Nett e Andes, 2016). No entanto, para pacientes com histórico de doença renal ou hepática, normalmente é indicado a utilização de formulações lipídicas por apresentarem toxicidade reduzida (Nett e Andes, 2016).

O fluconazol, outra droga utilizada no tratamento da Criptococose, pertence à classe dos triazólicos, atuando como substância fungistática na célula criptocócica. O seu mecanismo de ação envolve a redução da biossíntese de ergosterol por inativação da enzima lanosterol 14- α -demetilase impedindo a conversão do lanosterol em ergosterol (Lupetti *et al.*, 2002; Akins, 2005; Zavrel e White, 2015). A redução da síntese de ergosterol causa instabilidade na membrana plasmática e altera a permeabilidade da célula fúngica, resultando na interrupção do crescimento (Ghannoum e Rice, 1999; Casalnuovo *et al.*, 2004). No entanto, por se tratar de uma droga fungistática, a mesma torna a célula fúngica mais susceptível a ação do sistema imunológico. Outros azólicos, como posaconazol, voriconazol e itraconazol podem ser utilizados como terapia alternativa no tratamento da criptococose quando o fluconazol não se encontra disponível ou não é indicado (Perfect *et al.*, 2010), porém o uso do itraconazol não é recomendado para os casos de neurocriptococose, por apresentar baixa permeabilidade no SNC (Subramanian e Mathai, 2005).

A 5-Flucitosina é um análogo da pirimidina que atua interferindo na síntese de ácidos nucleicos e conseqüentemente na síntese protéica (Bennett *et al.*, 1979). No entanto, apesar de apresentar bom efeito terapêutico quando associada a Anfotericina B ou Fluconazol, a sua utilização apresenta algumas limitações, por necessitar de uma vigilância farmacológica rigorosa devido a sua alta toxicidade para a medula óssea e

fígado (Perfect e Bicanic, 2015). Além disso, o seu uso como monoterapia não é recomendado devido a seleção de populações resistentes (Akins, 2005). Ainda, é importante considerar, que a mesma não se encontra disponível no Brasil.

A busca por novas drogas antifúngicas e que apresentem alvos mais seletivos é extremamente importante frente ao arsenal limitado de antifúngicos, a alta toxicidade associada a esses fármacos e a resistência microbiana. Alguns estudos vêm sendo desenvolvidos buscando novos alvos na célula fúngica, como na síntese de glicosilceramida, função mitocondrial e transporte de vesículas (Perfect, 2017). No entanto, apesar de algumas drogas já estarem em fase clínica de avaliação, os investimentos direcionados para o estudo de infecções fúngicas é reduzido, o que muitas vezes impede o início ou a continuidade de pesquisas voltados para essa vertente (Rodrigues, 2016). Como alternativa, o reposicionamento de fármacos vem sendo utilizado, por se tratar de uma linha de pesquisa menos onerosa e que possibilita maior agilidade no processo para a aplicação clínica do fármaco. Um estudo realizado por Ribeiro e colaboradores (2017), por exemplo, demonstrou que a atorvastatina pode ser um adjuvante no tratamento da Criptococose. Nesse estudo, o uso da atorvastatina combinada ao fluconazol foi capaz de aumentar a sobrevivência dos animais e reduzir a carga fúngica recuperada do cérebro e pulmão (Ribeiro *et al.*, 2017). Não obstante, outros estudos também já demonstraram o efeito adjuvante da sertralina e do tamoxifeno no tratamento da criptococose (Dolan *et al.*, 2009; Zhai *et al.*, 2012; Perfect, 2017).

Apesar dos esforços para o desenvolvimento de novos antifúngicos e para o reposicionamento de fármacos, também é importante a avaliação de melhores estratégias para o uso dos antifúngicos já existentes. Nesse sentido, Santos e colaboradores (2017) avaliaram em modelo murino de criptococose o efeito da combinação entre Fluconazol e anfotericina B. Os autores observaram que uma dose maior de fluconazol combinada a anfotericina B é mais eficiente no tratamento da criptococose murina do que quando usado em monoterapia (Santos *et al.*, 2017). Contudo, estratégias que visam otimizar a utilização dos antifúngicos clássicos podem ser alternativas promissoras frente a esse arsenal limitado de fármacos.

2. JUSTIFICATIVA

A criptococose é uma micose invasiva responsável por 220.000 mil novos casos anualmente de meningite, por *C. neoformans*, com elevada taxa de mortalidade, (81%). Sua etiologia está principalmente relacionada as espécies de *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans*. Em estudos publicados de diferentes países (Austrália; Papua Nova Guiné; Colúmbia Britânica, Canadá; EUA), a taxa de mortalidade de infecções por *C. gattii* varia de 13 a 33% (Lalloo *et al.*, 1994; Galanis *et al.*, 2010; Harris *et al.*, 2011; Harris *et al.*, 2013). No entanto, essa variação geográfica na prevalência para *C. gattii* está associada a características específicas de cada região, que são determinantes para o diagnóstico, tratamento e acompanhamento da doença. Além de apresentar elevada prevalência, a criptococose é motivo de preocupação devido ao seu diagnóstico negligenciado e tratamento prolongado que muitas vezes está associado a fortes efeitos colaterais.

A ocorrência da Criptococose depende de vários fatores, relacionados tanto ao fungo quanto ao hospedeiro. Em relação aos patógenos humanos, um grande desafio durante a ocupação de nicho contrastante, é a adaptação a diferentes condições, como temperatura, osmolaridade, salinidade, pressão, estresse oxidativo e disponibilidade nutricional, que podem constituir fontes de estresse que precisam ser toleradas e superadas. Como patógenos, *C. neoformans* e *C. gattii* enfrentam exatamente essas situações durante a transição do ambiente para o hospedeiro humano. Essa capacidade de tolerar e se estabelecer em diferentes nichos, do ambiente ao hospedeiro, está associada à diversidade fenotípica de *Cryptococcus*.

Entretanto, apesar da diversidade fenotípica de *Cryptococcus* estar bem estabelecida na literatura, poucos trabalhos avaliaram essa diversidade diretamente no hospedeiro. A maioria dos trabalhos correlacionou alterações fenotípicas *in vitro* com a virulência *in vivo*, mas pouco se sabe se essas alterações *in vitro* se reproduzem *in vivo*.

Nesse contexto, esse trabalho visa avaliar e compreender a diversidade fenotípica de *Cryptococcus*, *in vitro* e *in vivo*, o que pode oferecer subsídios para o melhor entendimento a diversidade biológica desse microrganismo impacta na patogênese da criptococose.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da diversidade fenotípica de *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans* na progressão da criptococose em modelo murino.

3.2 Objetivos específicos

✓ Estratégias *in vitro*

- Avaliar o perfil de sensibilidade das diferentes linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii* aos antifúngicos clínicos fluconazol, itraconazol e anfotericina B.
- Caracterizar as linhagens em diferentes parâmetros fisiológicos relacionados à virulência de *C. gattii* e *C. neoformans*, como:
 - Fenótipo de melanização e atividade de lacase;
 - Termotolerância
 - Curva de crescimento em diferentes condições nutricionais
 - Análise morfológica da cápsula polissacarídica e do diâmetro celular;

✓ Estratégias *in vivo*

- Avaliar a influência das linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans* na sobrevivência em modelo murino de criptococose.
- Avaliar os seguintes parâmetros após infecção em modelo murino com *C. gattii* e *C. neoformans*:
 - Recuperação de unidades formadoras de colônias do pulmão, baço e cérebro
 - Análise da função neurológica e motora (SHIRPA) após a infecção.
 - Análise das variações morfológicas no lavado e pulmão

4. METODOLOGIA

4.1 Microrganismos

Nesse trabalho foram utilizadas cinco linhagens de *C. gattii*, sendo este grupo constituído por quatro linhagens de referência da *American Type Culture Collection* (WM 161, WM 178, WM 179, WM 779), e uma linhagem (R265) isolada em um paciente em Duncan, durante um surto na Columbia Britânica (Canadá) (Ma e May, 2009) (Ma *et al.*, 2009) (Tabela 4). Além disso, também foram utilizadas cinco linhagens de *C. neoformans*, uma isolada (H99) no Centro Médico da Universidade de Duke, Carolina do Norte (Estados Unidos) e quatro linhagens de referência (WM 626, WM 628, WM 629, WM 148) (Tabela 4). Todas as amostras foram mantidas em estoque no freezer -80°C e repicadas em meio Agar Sabouraud-dextrose (ASD), incubadas por 48h-72h a 35°C para a realização de cada experimento.

Tabela 4: Relação das linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans* que foram utilizadas neste estudo (*American Type Culture Collection*).

Linhagens de <i>C. gattii</i>	Genótipo/Sorotipo	Origem
WM 161 (ATCC® MYA-4562™)	VG III B	Ambiental (Eucalipto) - San Diego (EUA)
WM 178 (ATCC® MYA-4561™)	VG II B	Clínico – Austrália
WM 179 (ATCC® MYA-4560™)	VG I C	Clínico – Austrália
WM 779 (ATCC® MYA-4563™)	VG IV C	Veterinária (Guepardo) – África do Sul
R265 (ATCC® MYA-4093™)	VG II A	Clínico – Vancouver (Canadá)
Linhagens de <i>C. neoformans</i>	Genótipo/Sorotipo	Origem
WM 148 (ATCC® MYA-4564™)	VN I A	Clínico – Austrália
WM 626 (ATCC® MYA-4565™)	VN II A	Clínico – Austrália
WM 628 (ATCC® MYA-4566™)	VN III AD	Clínico – Austrália
WM 629 (ATCC® MYA-4567™)	VN IV D	Clínico – Austrália
H99 (ATCC® 208821™)	VNI - A	Clínico – Nova York

4.2 Antifúngicos

Nesse trabalho foram utilizados os antifúngicos clínicos fluconazol (Sigma-Aldrich®), anfotericina B (Sigma-Aldrich®) e itraconazol (Sigma-Aldrich®).

4.3 Experimentação *in vitro*

4.3.1 Avaliação da susceptibilidade aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e itraconazol.

A susceptibilidade das amostras fúngicas frente aos antifúngicos clínicos foi determinada segundo a metodologia de microdiluição em caldo presente no documento M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI*, anteriormente denominado NCCLS - *National Committee for Clinical Laboratory Standards* para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos avaliados (CLSI, 2008).

4.3.1.1 Diluição dos antifúngicos

Para determinar a susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos, foram utilizadas as seguintes drogas: itraconazol, fluconazol e anfotericina B. Soluções estoque na concentração de 1000 µg/mL foram preparadas para cada uma das drogas, sendo o itraconazol e a anfotericina B solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e o fluconazol dissolvidos em água. A partir das soluções estoques dos antifúngicos, foram realizadas diluições seriadas em meio sintético RPMI 1640 tamponado (pH 7,0) com ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS); sendo obtidas 10 concentrações finais que irão variar de 16 µg/mL a 0,0313 µg/mL para anfotericina B e itraconazol e 64 µg/mL a 0,122 µg/mL para fluconazol.

Alíquotas de 100 µl de cada diluição foram distribuídas nos poços da placa de microdiluição de 96 poços. Foi utilizada uma placa para cada droga e as concentrações foram distribuídas em ordem decrescente conforme na Figura 4. Em cada placa foram definidos os seguintes controles: (1) crescimento, contendo apenas RPMI 1640 + Inóculo e (2) esterilidade, contendo apenas o meio RPMI 1640. Após a microdiluição das drogas, as placas foram fechadas, embaladas em filme transparente e refrigeradas a -20°C até o momento do uso. Devido à fotossensibilidade, as placas de anfotericina B foram armazenadas com papel alumínio.

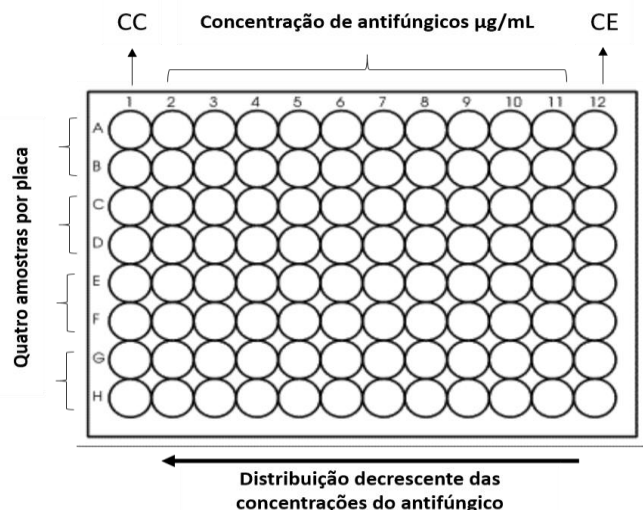


Figura 4. Esquema de um teste de concentração inibitória mínima em placa de microdiluição de 96 poços. CC) Controle de crescimento (RPMI +Inóculo), CE) Controle de esterilidade (RPMI). Os números de 2 a 11 indicam as concentrações, que podem variar de acordo com o agente antifúngico. Os colchetes indicam que os testes foram realizados em duplicata e que cada placa comporta até quatro isolados.

4.3.1.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado pelo método espectrofotométrico proposto por Pfaller et al. (1988). Amostras de *C. gattii* e *C. neoformans* foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose e incubadas a 35°C por 72h. A massa de células obtida foi recolhida assepticamente e suspensa em tubos contendo 5 mL de solução salina 0,85% esterilizada. Após homogeneização em vórtex, a transmitância foi medida em espectrofotômetro a 530nm, sendo ajustada para 75% a 77%, o que corresponde a uma suspensão de 1×10^6 a 5×10^6 células/mL. Posteriormente, para o preparo da suspensão de trabalho, foi realizada uma diluição de 1:50 seguida de uma diluição de 1:20 da suspensão padrão em meio líquido RPMI 1640, resultando na concentração de $1,0 \times 10^3$ células/mL. Então, alíquotas de 100µL desse inóculo foram dispensadas nas placas de 96 poços contendo os antifúngicos. Cada amostra foi testada em duplicata, obtendo um total de quatro amostras por placa.

As placas foram incubadas a 35°C, por 72 horas, e posteriormente foi realizada leitura visual conforme padronizado pelo CLSI.

4.3.1.3 Leitura e interpretação dos resultados da CIM

A leitura da concentração inibitória mínima foi realizada visualmente, após 72 horas de incubação, comparando o controle de crescimento do microrganismo com o

crescimento observado nos outros poços com as diferentes concentrações de antifúngicos. Para os derivados azólicos (fluconazol e itraconazol) a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi considerada como a correspondente ao poço no qual houver redução de 50% do crescimento fúngico em relação ao controle de crescimento. Para a anfotericina B, foi realizada a mesma leitura, porém observando o poço que apresentou inibição de 100% do crescimento (CLSI, 2008)

4.3.2 Análise morfométrica

Para a análise morfométrica das linhagens, células de *C. gattii* e *C. neoformans* previamente cultivadas em SDL, MML, MML + SFB ou variações do MML (ausência de glicina, ausência de glicose, 50% glicose, 25% glicose, 12,5% glicose, ausência de sulfato de magnésio, ausência de fosfato de potássio ou ausência de sulfato de magnésio e fosfato de potássio simultaneamente) por 5 dias a 37 °C. Após a incubação, uma alçada de cada cultivo foi suspensa em uma lâmina com tinta nanquim, para posterior visualização em microscópio óptico e captura de imagem. Os tamanhos das células e cápsulas de pelo menos 50 espécimes de cada cultivo foram mensurados com o auxílio do programa Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>; National Institutes of Health, NIH, Bethesda, MD) (Araujo *et al.*, 2012). Além disso, a razão superfície/volume foi determinada usando a fórmula $3/r$, em que r = raio (Ferreira *et al.*, 2015) e a razão espessura capsular/ raio do corpo celular foi dada pela fórmula E_c/r , em que E_c = espessura capsular e r = raio do corpo celular.

4.3.3 Indução de melanização

A produção de melanina foi avaliada em meio mínimo sólido (15 mM glicose, 10mM MgSO₄, 29.4mM KHPO₄, 13mM glicina, e 18g/L de ágar bacteriológico, pH 5.5) suplementado com 1mM de L-dopa. Inicialmente, amostras de *C. gattii* e *C. neoformans* foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose e incubadas a 37°C por 72h. A massa de células obtida foi recolhida assepticamente e suspensa em tubos contendo 5 mL de solução salina 0,85% esterilizada. Após homogeneização em vórtex, a transmitância foi medida em espectrofotômetro a 530nm, sendo ajustada para 75% a 77%, o que corresponde a uma suspensão de 1×10^6 a 5×10^6 células/mL. Em seguida foram realizadas quatro diluições seriadas de 1:10 de cada suspensão e posteriormente 5µL de cada diluição foram plaqueados em MM com e sem L-dopa. As placas foram

incubadas à 37°C e 28°C durante cinco dias e, posterior a esse tempo, foram fotografadas e comparadas com o controle sem L-dopa (García-Rodas *et al.*, 2015).

4.3.4 Avaliação da atividade da enzima lacase

Inicialmente, amostras de *C. gattii* e *C. neoformans* foram cultivadas em meio mínimo sólido (15 mM glicose, 10mM MgSO₄, 29.4mM KHPO₄, 13mM glicina, e 18g/L de ágar bacteriológico, pH 5.5). A massa de células obtida foi recolhida suspensa em solução salina 0,85% esterilizada e terá a transmitância ajustada para 75 a 77% em espectrofotometro a 530nm. Em seguida, as células foram suspensas em PBS e diluídas para 1x10⁸ células viáveis/mL. Então, 100µL de ABTS 10mM foram adicionados a 900 µL da suspensão fúngica e incubados “overnight”. Após incubação, as células foram centrifugadas e procedida a leitura da absorbância do sobrenadante a 420nm. Foi utilizada uma suspensão de células sem ABTS como controle negativo. A absorbância detectada corresponde a oxidação do ABTS pela enzima lacase. Assim, o valor obtido, foi indiretamente proporcional a atividade da enzima (Martinez *et al.*, 2007) .

4.3.5 Avaliação da atividade da enzima urease

O inóculo fúngico, previamente cultivado em meio YEPG (*Yeast Extract-Glucose-Peptone agar*) (3g/L extrato de levedura, 5 g/L peptona, 5 g/L glicose e 18 g/L ágar) foi suspenso em 2ml de água destilada esterilizada e mensurado em espectrofotômetro a 600 nm, obtendo uma absorbância entre 0,8 a 1,0, que equivale a 1 x 10⁸ a 2 x 10⁸cels/ml. A suspensão foi homogeneizada em vórtex e em seguida 1ml dessa suspensão foi adicionada a 1ml de caldo RUH (*Rapid Urea Broth*) (2,0 g Ureia, 0,01 g extrato de levedura, 1,0 mg vermelho de fenol, 0,1365 g KH₂PO₄ e 0,1425 g Na₂HPO₄; em 100mL de água destilada). Após a combinação da suspensão fúngica com o caldo RUH, a mistura foi incubada à 37°C com 40 agitações por minuto. Após 4 horas de incubação, a solução foi centrifugada e o sobrenadante reovido para posterior leitura espectrofotometrica com absorbância a 560nm. Utilizou-se como controle negativo uma suspensão contendo caldo RUH (1 ml de 1x RUH caldo misturado com 1 ml de água destilada).

4.3.6 Curva de crescimento de *C. gattii* e *C. neoformans*

Para determinação da curva de crescimento das linhagens, células previamente cultivadas em meio ASD à 35°C por 72h foram suspensas em 1mL de solução salina e posteriormente contadas em câmara de Neubauer. A partir da contagem foi realizada diluição em meio líquido RPMI 1640, SDL, MML, ou variações do MML (ausência de glicina, ausência de glicose, 50% glicose, 25% glicose, 12,5% glicose, ausência de sulfato de magnésio, ausência de fosfato de potássio ou ausência de sulfato de magnésio e fosfato de potássio simultaneamente) obtendo uma concentração final de 5×10^5 cels/mL. Desse inóculo, alíquotas de 200 μ L (1×10^5 cel) foram dispensadas em placa de 96 poços e incubadas em leitor de ELISA a 37°C ou 28°C durante 72 horas, com comprimento de onda ajustado para 600nm e intervalo de leituras a cada uma hora. Para cada linhagem foram realizadas oito replicatas. O aumento da população microbiana é proporcional a absorbância detectada. O parâmetro Área Sob a Curva (ASC) foi utilizado para comparar os grupos, essa análise foi realizada no software Prism, onde basicamente, se calcula a integral com a finalidade de encontrar área de uma região plana sob uma curva no plano cartesiano, onde estas curvas são definidas por funções.

4.4 Experimentação *in vivo*

Para o modelo animal foram utilizados camundongos machos C57BL/6 com seis semanas, adquiridos do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram divididos em grupos de seis por gaiola, inclusive para os grupos controles. Foram fornecidos água e ração continuamente e os ciclos de claro/escuro foram mantidos. Este trabalho foi aprovado (protocolo 235/2017) pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais conforme previsto na lei e encontra-se em processo de avaliação.

4.4.1 Avaliação da sobrevivência em modelo murino de infecção por *Cryptococcus gattii* ou *C. neoformans*.

Para avaliação da influência do tipo molecular de *Cryptococcus* na sobrevivência dos animais, as linhagens desse estudo foram utilizadas na indução da criptococose em modelo murino. As linhagens foram previamente cultivadas em ágar Sabouraud dextrose a 35°C durante 48 horas. Em seguida, as células foram transferidas para

solução salina estéril e o inóculo foi quantificado em câmara de Neubauer e ajustado para 1×10^5 células em 30 μ l.

Os camundongos foram previamente anestesiados com solução de cetamina e xilazina em PBS (80 mg/Kg/10 mg/Kg). Após 10 minutos, foi realizada uma pequena incisão na pele, próxima a tireóide e após a separação das camadas dos tecidos, a traquéia foi exposta e inoculada com 30 μ L da suspensão fúngica, e em seguida, a incisão foi suturada. Após o procedimento, os grupos experimentais foram mantidos em gaiolas separadas, os animais receberam água e ração continuamente e foram monitorados diariamente até sucumbirem. Em paralelo a curva de sobrevivência, foi realizada a avaliação da função motora e neurológica dos animais pelo protocolo SHIRPA.

Após realizada a curva de sobrevivência para cada linhagem, foi então, determinado o tempo ideal de eutanásia (10 dias) para a retirada do LBA, pulmão, baço e cérebro para análise da carga fúngica.

4.4.2 Avaliação comportamental dos animais infectados com *C. gattii* ou *C. neoformans* – Protocolo SHIRPA

O SmithKline/Harwell/Imperial College/Royal Hospital/PhenotypeAssessment (SHIRPA) representa protocolos padronizados para avaliação comportamental e funcional de distúrbios neurológicos em modelos animais. O protocolo avalia o estado neuropsiquiátrico, comportamento motor, função autônoma, tônus e força muscular, e função e reflexo sensorial. O SHIRPA foi realizado como análise comportamental de acordo com estudos anteriores, para avaliação do perfil de morbidade dos animais frente a infecção por diferentes tipos moleculares de *C. gattii* e *C. neoformans* (Rogers *et al.*, 1997; Rogers e Barker, 2003; Pedroso *et al.*, 2010). O protocolo foi aplicado em todos os animais a partir do terceiro dia pós-infecção com intervalos variados, até os animais sucumbirem.

O teste inicia-se com a pesagem do animal. A seguir, o animal é colocado em uma jarra de observação por cinco minutos para avaliar a posição corporal, atividade espontânea, taxa de respiração, presença de tremor defecação (número de bolos fecais), micção, número de “headings” (apoio apenas sobre as patas traseiras) e “groomings” (o “limpar”, movimentos dirigidos à cabeça ou ao corpo, efetuados com as patas dianteiras). Após, o animal foi solto em uma arena (ou “open-field”) e foram observadas

a excitação de transferência, atividade locomotora (número de entradas em quadrados demarcados na arena em 30 segundos), fechamento de pálpebras, piloereção, ambulação, elevação pélvica, elevação da cauda, escape ao toque e passividade posicional. O animal foi, então, suspenso pela cauda e avaliado, sobre uma grade colocada acima da arena, quanto à presença de encurvamento de tronco, ação de segurar as patas traseiras, posicionamento visual, força ao agarrar, tônus corporal, pinnareflex, reflexo corneal, beliscada nos dedos da pata traseira e manobra no arame. Também foram avaliados a cor da pele, frequência cardíaca, tônus dos membros, tônus abdominal, lacrimejamento, salivação, mordida provocada, reflexo postural, geotaxis negativo, medo, irritabilidade, agressão e vocalização. A tabela 4 detalha os parâmetros que foram avaliados.

Tabela 5: Resumo dos parâmetros avaliados pelo protocolo SHIRPA

Domínios clínicos	Parâmetros (Rogers <i>et al.</i>, 1997; Pedroso <i>et al.</i>, 2010)
Tônus e força muscular	Tônus muscular e força ao agarrar, tônus corporal, tônus dos membros, tônus abdominal
Comportamento motor	Posição corporal, tremor, atividade locomotora, elevação pélvica, manobra no arame, geotáxis negativo, elevação da cauda, encurvamento do tronco, ambulação, segurar as patas.
Estado neuropsiquiátrico	Atividade espontânea, transferência lateral, escape ao toque, passividade posicional, agressão, irritabilidade, vocalização, mordida provocada e medo.
Função autônoma	Taxa respiratória, defecação, micção, fechamento de pálpebras, piloereção, cor da pele, lacrimação, salivação.
Função e reflexo sensorial	Pina reflex, reflexo corneal, posicionamento visual, beliscada nos dedos da pata traseira

4.4.3 Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC)

O cérebro, pulmão, baço e lavado broncoalveolar dos animais foram retirados, triturados e diluídos (pulmão) até 1:1000 para quantificação de UFC. Após triturados e diluídos, 50 µL de cada órgão foram plaqueados em ASD, em duplicatas, e incubadas a 35°C por 48 horas. Posteriormente, as colônias foram contadas visualmente e então estabelecido a quantidade de UFC/g de órgão ou UFC/mL de lavado.

4.4. 4 Cinética da infecção para avaliação das alterações morfológicas de *Cryptococcus in vivo* e sua influência na letalidade e transmigração para o sistema nervoso central

Para avaliação da influência das alterações morfológicas na letalidade e transmigração para o SNC de *Cryptococcus*, as linhagens preestabelecidas para esse ensaio (conforme será abordado nos resultados) foram previamente cultivadas em ágar Sabouraud dextrose a 37°C durante 48 horas. Em seguida, as células foram transferidas para solução salina estéril e o inóculo foi quantificado em câmara de Neubauer e ajustado para 1×10^7 células em 30µl.

Os camundongos foram previamente anestesiados com solução de cetamina e xilazina em PBS (80 mg/Kg/10 mg/Kg). Após 10 minutos, foi realizada uma pequena incisão na pele, próxima a tireóide e após a separação das camadas dos tecidos, a traquéia foi exposta e inoculada com 30µL da suspensão fúngica, e em seguida, a incisão foi suturada.

Após realizada a infecção os camundongos foram eutanasiados após 6 horas, 24 e 240 horas e então, determinada a carga fúngica no cérebro e morfologia no LBA e pulmão. A morfologia foi determinada seguindo o mesmo padrão utilizado para determinação morfométrica *in vitro*, porém, aqui utilizamos o macerado dos respectivos órgãos ao invés de culturas.

4.5 Análise estatística

Os dados foram analisados por meio do Software *Prism 5* (*GraphPad Inc.*, San Diego, CA, USA). O teste empregado foi a análise de variância (ANOVA), pós teste de múltiplas comparações, onde valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização fenotípica *in vitro*

5.1.1 Avaliação da susceptibilidade de *C. gattii* e *C. neoformans* ao fluconazol, a anfotericina B e ao itraconazol

Inicialmente foi determinado o perfil de susceptibilidade das linhagens frente aos antifúngicos fluconazol, anfotericina B e itraconazol. A escolha dos antifúngicos foi definida, considerando os fármacos preconizados para o tratamento da criptococose.

Para *C. gattii*, a concentração inibitória mínima (CIM) variou entre 0,25 e 1 µg/mL para anfotericina B, 2 e 8 µg/mL para o fluconazol e 0,03 e 0,025 µg/mL para o itraconazol. Enquanto para *C. neoformans*, a CIM variou entre 0,06 e 0,25 µg/mL para anfotericina B, 1 e 4 µg/mL para o fluconazol e 0,03 e 0,06 µg/mL para o itraconazol (Tabela 6). Todas as linhagens foram sensíveis aos antifúngicos analisados, conforme pontos de corte pré-estabelecidos para *Candida* spp. (CLSI 2012).

Tabela 6. Concentração inibitória mínima (CIM - µg/mL) de anfotericina B, fluconazol e itraconazol frente a cinco linhagens de *C. gattii* e cinco de *C. neoformans*.

Linhagem	Droga		
	Anfotericina ^a	Fluconazol ^b	Itraconazol ^b
<i>C. gattii</i>			
WM 161 (ATCC [®] MYA-4562 TM)	0,25	4	0,012
WM 178 (ATCC [®] MYA-4561 TM)	0,25	4	0,25
WM 179 (ATCC [®] MYA-4560 TM)	1	2	0,25
WM 779 (ATCC [®] MYA-4563 TM)	0,25	8	0,03
R265 (ATCC [®] MYA-4093 TM)	0,25	4	0,12
Variação da CIM			
CIM ₅₀ *	0,25 – 1	2 – 8	0,03 – 0,25
CIM ₉₀ **	0,25	4	0,12
Média geométrica	0,32	4	0,25
<i>C. neoformans</i>			
WM 148 (ATCC [®] MYA-4564 TM)	0,06	4	0,06
WM 626 (ATCC [®] MYA-4565 TM)	0,06	1	0,06
WM 628 (ATCC [®] MYA-4566 TM)	0,25	4	0,03
WM 629 (ATCC [®] MYA-4567 TM)	0,06	1	0,03
H99 (ATCC [®] 208821 TM)	0,25	4	0,03
Variação da CIM			
CIM ₅₀ *	0,06 – 0,25	1 – 4	0,03 – 0,06
CIM ₉₀ **	0,06	4	0,03
Média geométrica	0,25	4	0,06
Média geométrica	0,10	2,29	0,042

^aCIM (100%): *endpoint* considerando 100 % da inibição de crescimento

^bCIM (80%): *endpoint* considerando 80 % da inibição de crescimento

* CIM50: valor de CIM que inibiu 50% dos isolados

** CIM90: valor de CIM que inibiu 90% dos isolados

5.1.2 Fatores de virulência

Ensaio *in vitro* foram realizados para avaliar os fatores de virulência de *Cryptococcus* melhor caracterizados, tais como: perfil de crescimento em diferentes condições nutricionais, termotolerância, tamanho da cápsula polissacarídica, melanização e atividades das enzimas lacase e urease.

5.1.2.1 Determinação do perfil de crescimento de *C. gattii* e *C. neoformans* em diferentes condições nutricionais e de temperatura

Considerando a capacidade de *Cryptococcus* spp. em crescer em diferentes contextos nutricionais e que isso pode ser um determinante na virulência, nós decidimos avaliar como seria o perfil de crescimento das linhagens em diferentes meios de cultivo e temperatura. Para tanto, nós utilizamos o SD_L, MM_L e RPMI. A escolha do meio SD_L foi definida por se tratar de um meio complexo e que foi utilizado para a manutenção das linhagens. Enquanto o meio RPMI foi escolhido por ser um meio rico, quimicamente definido e padronizado para a realização de ensaios como susceptibilidade a antifúngicos. Por último, escolhemos o MM_L no intuito de simular uma possível situação de stress nutricional que poderia ocorrer no ambiente ou durante a interação com o hospedeiro, e por ser um meio amplamente utilizado para a indução de cápsula polissacarídica em *Cryptococcus* spp. Além disso, escolhemos as temperaturas de 28°C e 37°C para mimetizar, respectivamente, uma possível temperatura ambiental e do hospedeiro mamífero. Ao analisar os resultados determinamos qual meio de cultura permitia um melhor crescimento a 28 e 37°C, e se a temperatura era um determinante no crescimento, conforme a condição de cultivo.

Para *C. neoformans* nós observamos no MM_L, que todas as linhagens apresentaram a 37°C, um perfil de crescimento significativamente maior em relação ao SD_L e RPMI; exceto para a linhagem WM628 onde o crescimento foi significativamente maior no SD_L. Na temperatura de 28°C, o MM_L também se manteve como a melhor condição de cultivo, porém, para as linhagens H99 e WM628 não foi observado diferença estatística entre o MM_L e o SD_L. Quando avaliamos a influência da temperatura em cada meio de cultivo, nós vimos que, para as linhagens H99 e WM148 a temperatura não influenciou o crescimento quando cultivadas no MM_L. Enquanto para a WM626 e WM628, no MM_L, o crescimento foi significativamente maior a 28°C, já para

a WM629 o melhor crescimento ocorreu a 37°C. Em relação ao SDL, para a maioria das linhagens (WM626, WM628, WM629) o perfil de crescimento foi independente da temperatura. No RPMI, todas as linhagens apresentaram crescimento significativamente maior a 28°C, a menos a linhagem WM629, onde não houve diferença entre as temperaturas (Figura 5).

Em *C. gattii*, nós vimos, para a maioria das linhagens (R265, WM178, WM179, WM161) que o MM_L também foi a melhor condição de cultivo a 37°C. Na temperatura de 28°C, as linhagens WM779, R265 e WM179 apresentaram um perfil de crescimento significativamente maior no MM_L e SD_L. Enquanto para a WM178 e WM161, o crescimento foi maior somente no MM_L. Ao considerar a influência da temperatura em cada meio de cultivo, para as linhagens WM779, R265, WM178, WM179 crescidas em MM_L não houve diferença no crescimento entre 28°C e 37°C. Em relação ao SD_L, somente a linhagem WM178 apresentou melhor crescimento a 37°C, e para a WM161 o crescimento foi igual em ambas as temperaturas. No RPMI, a maioria das linhagens (WM779, WM178, WM179) apresentaram crescimento significativamente maior a 28°C, a menos as linhagens R265 e WM161, onde o crescimento foi significativamente maior a 37°C ou sem diferença entre as temperaturas, respectivamente (Figura 6).

Quando analisamos o efeito geral da condição nutricional e da temperatura no crescimento de *C. gattii* e *C. neoformans*, nós concluímos que no MM_L, condição pobre em nutrientes, há maior crescimento das linhagens na temperatura de 37°C (Figura 5 e 6).

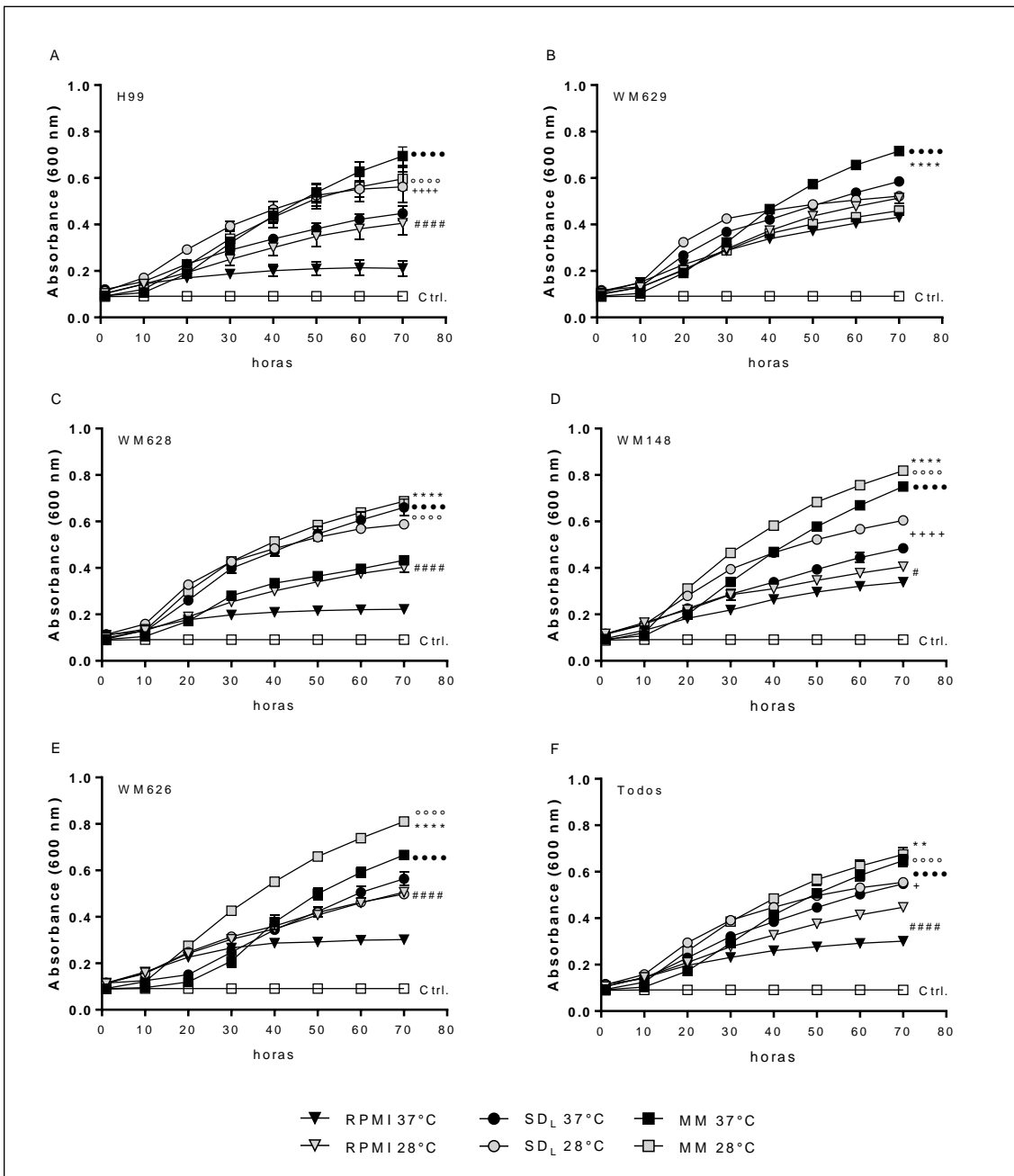


Figura 5. Curva de crescimento, em meio RPMI, SD_L e MM_L, a 28 e 37°C para as linhagens de *Cryptococcus neoformans* H99 (A), WM629 (B), WM628 (C), WM148 (D), WM626 (E) e todas as linhagens juntas (F). **Análise estatística:** o número de símbolos representa o nível de significância estatística para o valor de p; sendo assim: 1= p<0,05, 2= p<0,01, 4= p<0,0001. ● em relação as condições de cultivo a 37°C, ○ em relação as condições de cultivo a 28°C, * Em relação a temperatura no MM_L, # Em relação a temperatura no RPMI, + Em relação a temperatura no SD_L

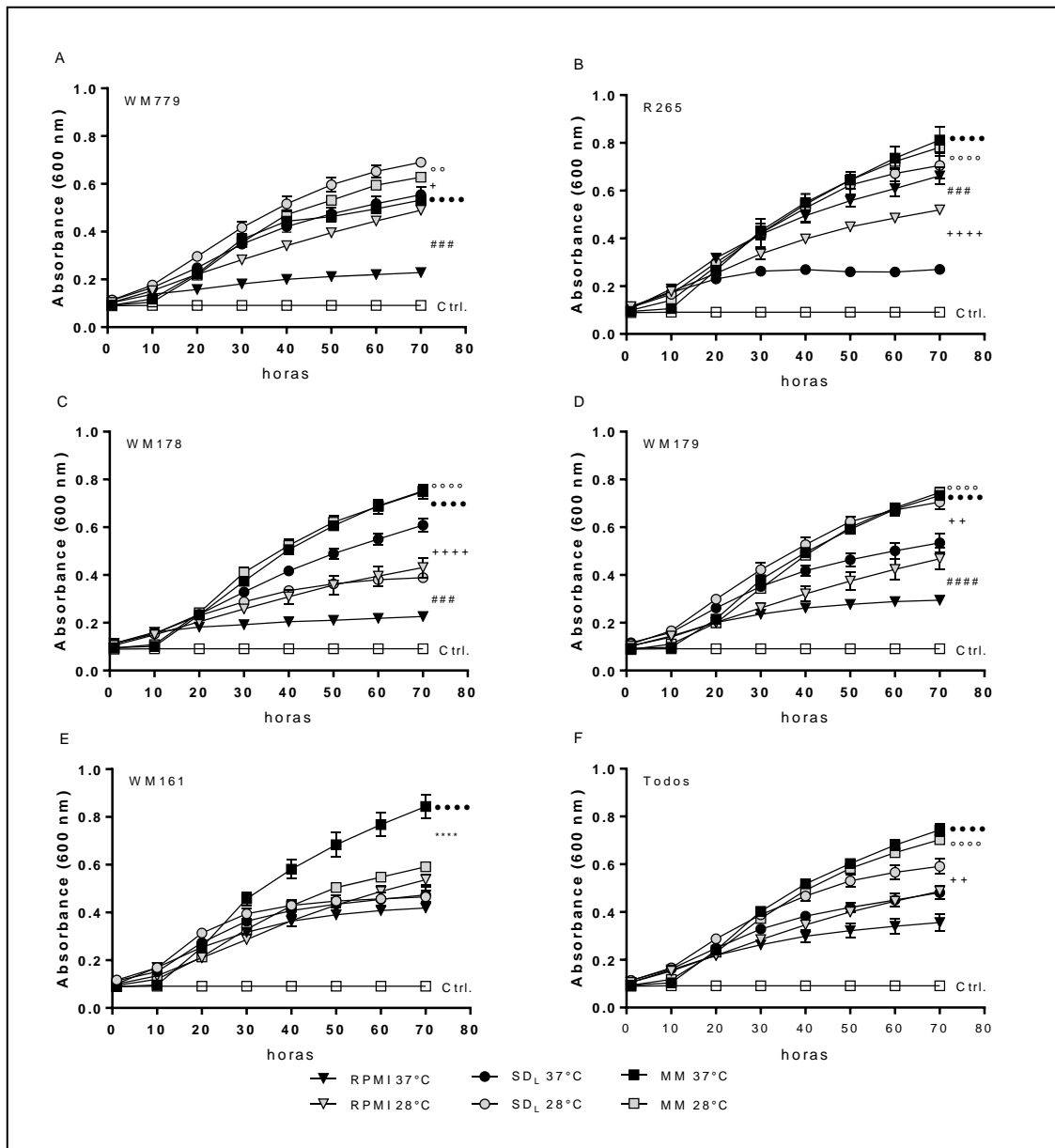


Figura 6. Curva de crescimento, em meio RPMI, SD_L e MM_L, a 28 e 37°C para as linhagens de *Cryptococcus gattii* WM779 (A), R265 (B), WM178 (C), WM148 (D), WM179 (E) e todas as linhagens juntas (F). **Análise estatística:** O número de símbolos representa o nível de significância estatística para o valor de p; sendo assim: 1= p<0,05, 2 = p<0,01, 3= p<0,001 e 4= p<0,001. ● em relação as condições de cultivo a 37°C, ○ em relação as condições de cultivo a 28°C, * Em relação a temperatura no MM_L, # Em relação a temperatura no RPMI, + Em relação a temperatura no SD_L.

5.1.2.2 Avaliação da morfologia de *C. gattii* e *C. neoformans* em diferentes condições nutricionais

A partir das diferenças observadas no crescimento das linhagens de acordo com a condição de cultivo, nós decidimos avaliar possíveis alterações morfológicas que poderiam influenciar o crescimento. Além disso, a análise morfológica permite determinar a espessura da cápsula polissacarídica, um importante fator de virulência para *Cryptococcus*. Para tanto, utilizamos o meio SD_L, meio complexo e rico em nutrientes; o MM_L, pobre em nutrientes e o MM_L + SFB10%, por ser um potente indutor no crescimento da cápsula polissacarídica. O meio RPMI foi excluído dessa análise por ser um meio rico em nutrientes, assim como o SD_L, e que foi utilizado apenas na avaliação da susceptibilidade aos antifúngicos.

Como esperado, o diâmetro celular, espessura da cápsula e a razão superfície/volume variaram de acordo com o meio de cultura utilizado. Todas as linhagens apresentaram um diâmetro significativamente menor ($p < 0,05$) (Figura 7A e D) e espessura capsular aumentada nos meios MM_L e MM_L + SFB10% (Figura 7B e E) em relação ao SD_L, exceto para as linhagens H99 e WM148, onde a espessura da cápsula foi significativamente menor ($p < 0,05$) ou não apresentou diferença estatística, respectivamente. De modo geral, observamos uma relação inversamente proporcional entre o diâmetro celular e a razão superfície/volume, ou seja, quando o diâmetro da célula foi significativamente menor ($p < 0,05$) em relação ao SD_L, a razão S/V foi aumentada ($p < 0,05$), e vice-versa (Figura 7C e F).

Ao avaliar os diferentes parâmetros morfológicos em relação a H99, para *C. neoformans* e R265 para *C. gattii*, conforme a condição de cultivo, nós vimos que a morfologia variou de acordo com cada linhagem analisada. Algumas linhagens (WM148, WM626 e WM628) quando crescidas em MM_L + SFB10% tiveram diâmetro celular significativamente maior e razão S/V diminuída em relação a H99 (Figura 6A e C); enquanto para *C. gattii*, todas as linhagens apresentaram um perfil oposto em relação a linhagem de referência R265 (Figura 7D e F).

Em geral, ao analisar a espessura capsular para *C. neoformans*, a linhagem WM629 quando crescida em MM_L + SFB10% apresentou uma cápsula significativamente maior em relação a H99, enquanto no meio mínimo o perfil da cápsula foi semelhante para todas as linhagens exceto para a WM148, onde a

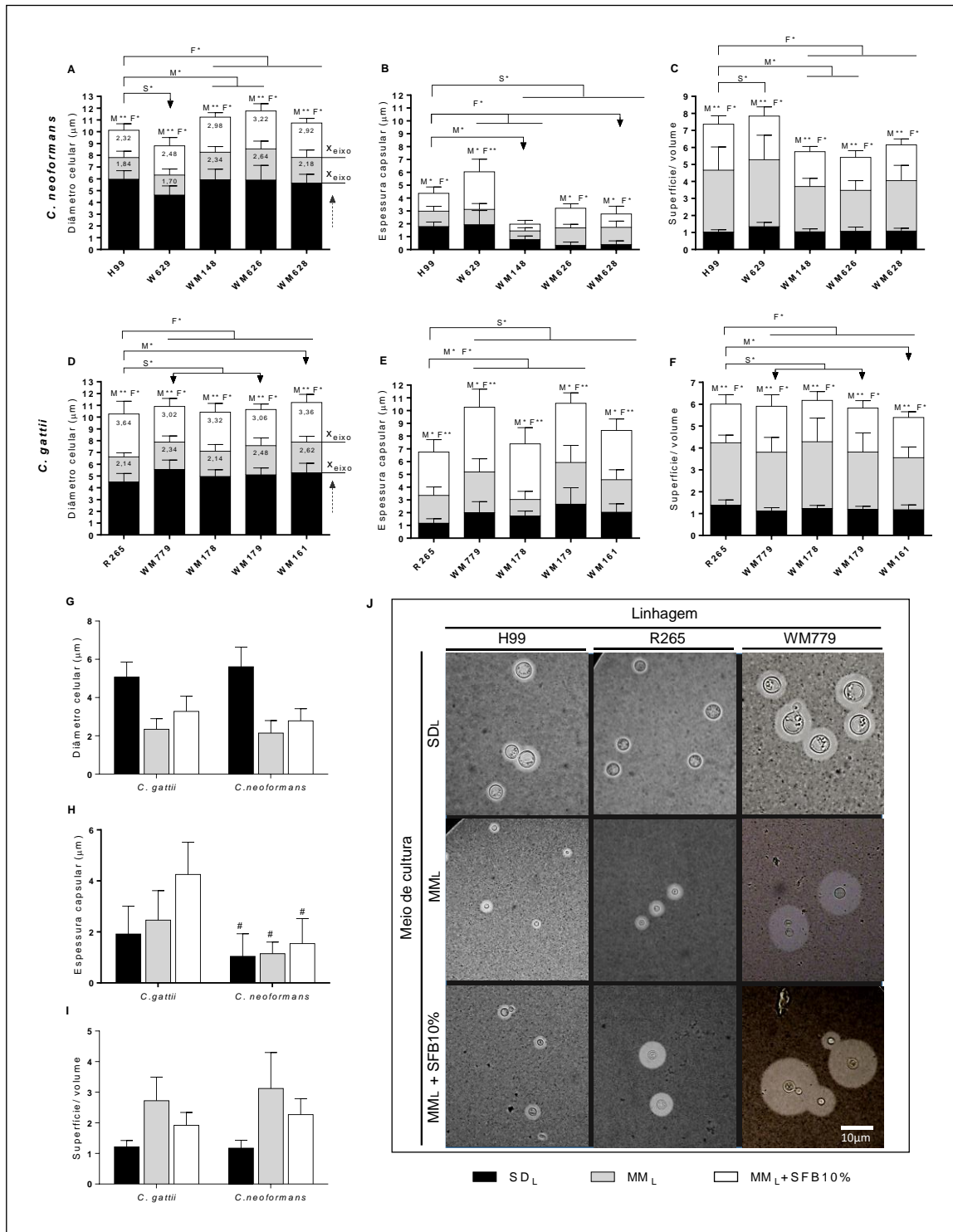


Figura 7. Determinação da morfologia em meio SD_L, MM_L, MM_L+SFB10% a 37°C para as linhagens de *Cryptococcus neoformans* (A), (B) e (C), *C. gattii* (D), (E) e (F) e todas as linhagens juntas por espécie (G), (H) e (I). Preparações de nanquim de cepas representativas de cada espécie, evidenciando aumento na cápsula quando cultivadas em MM_L, MM_L+SFB10% a 37°C SD_L durante cinco dias em relação ao crescimento no SD_L a 37°C SD_L durante cinco dias (J). SD_L ou S: Sabouraud dextrose líquido; MM_L ou M: Meio mínimo líquido; MM_L +SFB 10% ou F: Meio mínimo líquido mais soro fetal bovino a 10%. **Interpretação dos gráficos da letra A a F:** Para melhor representar os resultados, considerando o número de variáveis, utilizamos o gráfico de barras empilhadas. A seta pontilhada em cinza, presente nos gráficos A e D, indica que o eixo X se inicia no começo de cada segmento da barra; os números, por sua vez, indicam a média para cada variável. Representação estatística: As letras acima de cada barra indicam dentro de cada linhagem, qual meio de cultura apresentou valor significativo (p<0,05) em relação ao controle (SD_L), para a variável representada no eixo Y. As linhas acima de cada barra indicam as diferenças significativas para cada linhagem, em relação a H99 para *C. neoformans* e R265, para *C. gattii*; as linhas retas indicam que todas as linhagens na sua porção inferior apresentaram diferença estatística, enquanto para os colchetes na horizontal, as setas indicam exatamente qual linhagem apresentou diferença, em relação a R265 ou H99. **Análise estatística:** O número de símbolos representa o nível de significância estatística para o valor de p; sendo assim: 1= p<0,05 e 2 = p<0,01. # em relação a condição de cultivo.

espessura capsular foi estatisticamente menor (Figura 7B). Para *C. gattii*, na condição de MM_L + SFB10%, as linhagens WM779, WM178 e WM179 tiveram uma espessura capsular significativamente maior em relação a R265, enquanto no MM_L, somente as leveduras WM779 e WM179 mantiveram o perfil; já a linhagem WM178 teve uma espessura capsular significativamente menor (Figura 7E).

Quando nós analisamos o efeito global da condição de cultivo sobre os parâmetros estudados, nós concluimos que o cultivo de *C. gattii* e *C. neoformans* em meios nutricionalmente pobres, como o MM_L e MM_L + SFB10%, causa redução significativa ($p < 0,05$) do diâmetro celular e aumento ($p < 0,05$) da S/V e espessura capsular em relação ao meio rico SD_L (Figura 7A, B, C, D, E e F). Ao comparar as espécies, observou-se que *C. gattii* e *C. neoformans* apresentam diâmetro celular e razão S/V semelhantes considerando as diferentes condições de cultivo, porém, em relação à espessura capsular, a mesma foi significativamente maior para *C. gattii* em relação a *C. neoformans* (Figura 7G, H e I).

Prosseguindo com as análises morfológicas, nós vimos que a linhagem H99 teve uma espessura capsular significativamente menor nos meios pobres (MM_L e MM_L + SFB10%) em relação ao meio rico SD_L (Figura 7B). Além disso, para a linhagem WM148, também da espécie *C. neoformans*, nós não vimos diferenças na espessura capsular conforme a condição de cultivo (Figura 7B). No entanto, esses resultados nos chamaram a atenção, uma vez que em situações de estresse nutricional esperava-se que todas as linhagens apresentassem uma cápsula aumentada. Como forma de trabalhar matematicamente os resultados obtidos em nossas análises, nós estabelecemos uma razão entre a espessura da cápsula e o raio do corpo celular (Figura 8A) para que fosse possível determinar a proporção entre a cápsula polissacarídica e o corpo celular.

Surpreendentemente, nós vimos que a linhagem H99 e WM148 apresentavam uma razão significativamente maior quando crescida no MM_L ou MM_L + SFB10% em relação ao SD_L (Figura 8B). Para todas as outras linhagens, o mesmo perfil foi observado (Figura 8B e C). Quando comparamos a razão entre as linhagens, conforme a condição de cultivo, somente para a linhagem WM629 no MM_L + SFB10% observou-se uma razão significativamente maior ($p < 0,05$) em relação a linhagem H99 (Figura 8B). Para *C. gattii*, a linhagem WM779 se destacou por apresentar uma razão significativamente aumentada no MM_L e MM_L + SFB10% em relação a R265 (Figura 8B). Quando comparamos as espécies, *C. gattii* apresentou uma razão estatisticamente

maior, no MM_L e MM_L + SFB10%, em relação a *C. neoformans* (Figura 8C). A partir da razão estabelecida entre a espessura capsular e o corpo da célula, foi possível demonstrar que, a espessura capsular pode ser semelhante ou menor no MM_L e MM_L + SFB10% em relação ao SD_L, porém, ao considerar o tamanho do corpo celular, se tem uma maior proporção da cápsula polissacarídica.

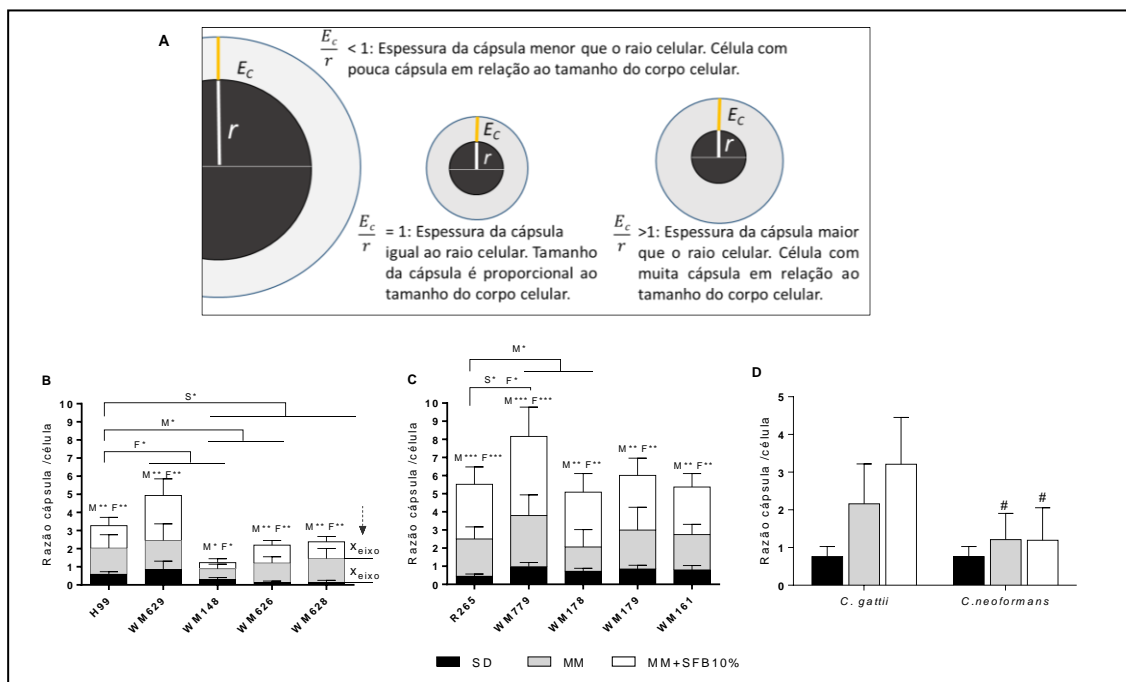


Figura 8. Fundamentação matemática para o estabelecimento da proporção entre a cápsula polissacarídica e o corpo celular (A). Determinação dessa proporção em meio SD_L, MM_L, MM_L+SFB10% a 37°C para as linhagens de *Cryptococcus neoformans* (B), *C. gattii* (C) e todas as linhagens juntas por espécie (D). MM_L ou M: Meio mínimo líquido; MM_L +SFB 10% ou F: Meio mínimo líquido mais soro fetal bovino a 10%. **Interpretação dos gráficos da letra B e C:** Para melhor representar os resultados, considerando o número de variáveis, utilizamos o gráfico de barras empilhadas. A seta pontilhada em cinza, presente nos gráficos A e D, indica que o eixo X se inicia no começo de cada segmento da barra; os números, por sua vez, indicam a média para cada variável. Representação estatística: As letras acima de cada barra indicam dentro de cada linhagem, qual meio de cultura apresentou valor significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle (SD_L), para a variável representada no eixo Y. As linhas acima de cada barra indicam as diferenças significativas para cada linhagem, em relação a H99 para *C. neoformans* e R265, para *C. gattii*. As linhas retas indicam que todas as linhagens na sua porção inferior apresentaram diferença estatística. **Análise estatística:** O número de símbolos representa o nível de significância estatística para o valor de p; sendo assim: 1= $p < 0,05$, 2 = $p < 0,01$, 3 = $p < 0,001$. # em relação a condição de cultivo.

Ainda, durante as análises microscópicas, nós vimos que a linhagem WM779 - *C. gattii* quando crescida em MM_L apresentava algumas células irregulares, com brotamentos múltiplos, dos quais as células filhas não se desligavam da célula mãe, sugestivo de um processo de pseudofilamentação (Figura 9A). Considerando essa variação morfológica, nós decidimos investigar quais componentes do MM_L poderiam ser importantes para essas alterações, para isso nós utilizamos variações do MM_L em que algum substrato (glicina, magnésio e potássio) foi removido ou teve a sua concentração reduzida gradativamente (glicose).

Inicialmente realizamos uma curva de crescimento onde verificamos a importância de cada substrato para o crescimento da linhagem, e posteriormente, procedemos às análises microscópicas para verificar a presença de possíveis células irregulares. Como controle, nós utilizamos a linhagem H99 – *C. neoformans*, por ser uma linhagem de outra espécie e que não apresentou células irregulares quando crescida no MM_L.

Ao analisar a curva de crescimento, nós vimos que a ausência de glicina, magnésio ou potássio diminuiu significativamente o crescimento das linhagens WM779 e H99 em relação ao MM_L padrão, porém, essa redução no crescimento é ainda mais evidente na ausência de potássio ou quando o potássio e o magnésio são removidos simultaneamente (Figura 9B).

Para a glicose, a redução do crescimento foi dependente da concentração, entretanto, para a linhagem H99 não foi observado crescimento na ausência do carboidrato, embora na concentração de 50% de glicose, observa-se um crescimento significativamente maior para a mesma em relação à linhagem WM779 (Figura 9C). Em relação às alterações morfológicas, observou-se que as variações na concentração de glicose foram determinantes para a formação de células irregulares para a linhagem WM779. Nas outras variações do meio mínimo não foram observadas células com morfologia irregular, assim como, para a linhagem H99 quando crescida em diferentes concentrações de glicose (Figura 9D).

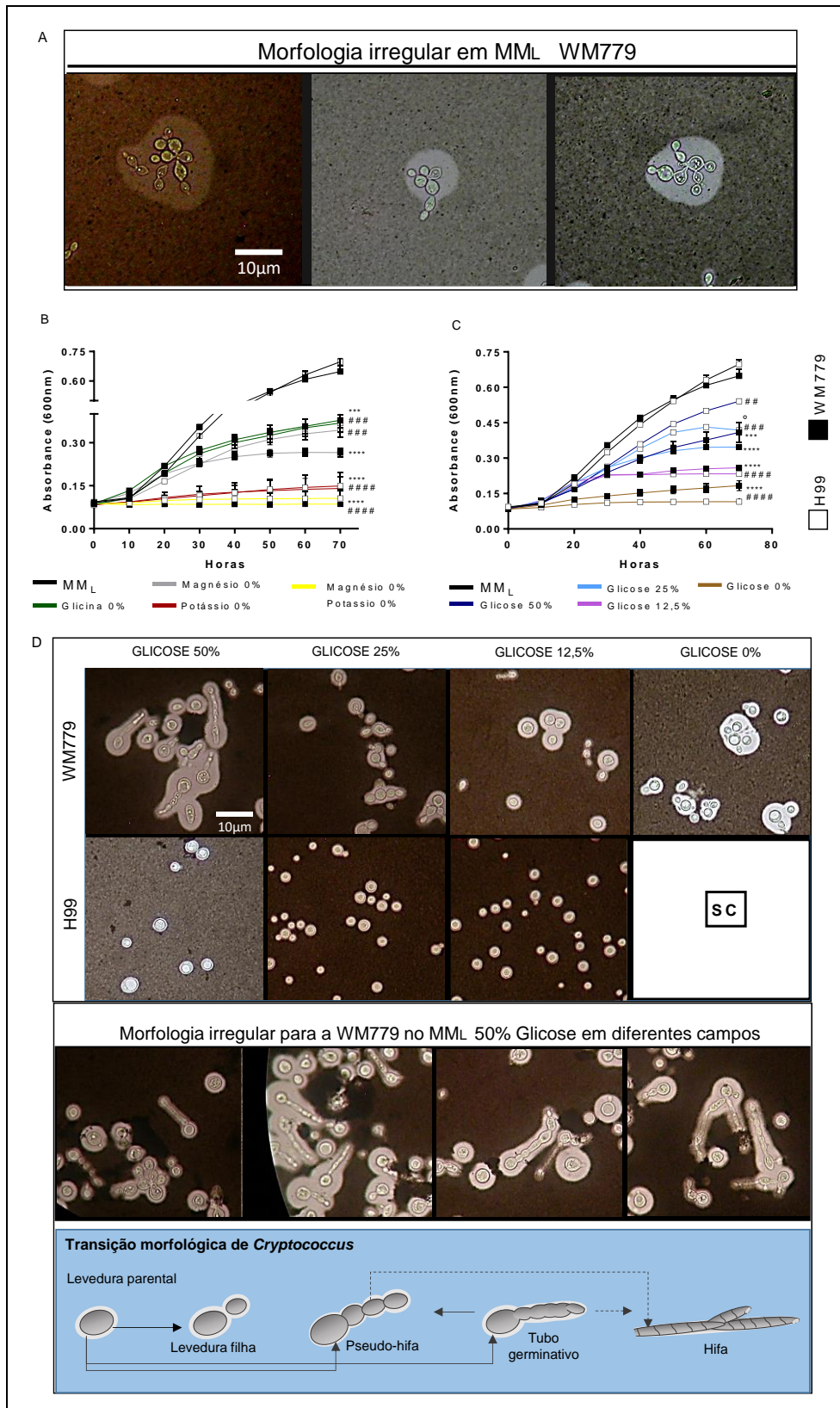


Figura 9. Avaliação da influência de diferentes componentes do MML na formação de células irregulares para a linhagem WM779. Preparações de nanquim da linhagem de *C. gattii* WM779 cultivada em MML durante cinco dias evidenciando a formação de células irregulares características de pseudo-hifas (A); Curva de crescimento, em meio MML, MML(0% GLICINA), MML(0% MAGNÉSIO), MML(0% POTÁSSIO), MML(0% POTÁSSIO E MAGNÉSIO) a 37°C para as linhagens de *C. gattii* WM779 e *Cryptococcus neoformans* H99 (B); Curva de crescimento, em meio MML, MML(50% GLICOSE),

MM_L(25% GLICOSE), MM_L(12,5% GLICOSE), MM_L(0% GLICOSE) a 37°C para as linhagens de *C. gattii* WM779 e *Cryptococcus neoformans* H99 (C); Preparações de nanquim da linhagem de *C. gattii* WM779 e cultivadas em MM_L, MM_L(50% GLICOSE), MM_L(25% GLICOSE), MM_L(12,5% GLICOSE), MM_L(0% GLICOSE) durante cinco dias comparada a *C. neoformans* H99 cultivado no mesmo tempo e condição de cultivo (D). Representação esquemática da transição morfológica de *Cryptococcus* de levedura para hifa, evidenciando as possíveis variações morfológicas que podem ocorrer durante essa transição, as mesmas observadas para a linhagem WM779 quando crescida no MM_L (50% GLICOSE); as setas tracejadas indicam para uma morofologia da qual não observamos, mas, que pode ocorrer. SC: Sem crescimento. **Análise estatística:** o número de símbolos representa o nível de significância estatística para o valor de p; sendo assim: 1= p<0,05, 2 = p<0,01, 3=p<0,001, 4= p<0,0001. # Em relação a linhagem H99 no MM_L, * Em relação a linhagem WM779 no MM_L, ◊ Diferença entre a linhagem WM779 e HH99 no MM_L (50% GLICOSE).

5.1.4 Perfil de melanização e atividade das enzimas lacase e urease para *C. gattii* e *C. neoformans*

A produção de melanina dos isolados de *C. gattii* e *C. neoformans* foi avaliada por meio de ensaios de placa spot e espectrofotométrico. Após 96 h de incubação do isolados, diluídos em série e dispensados em meio mínimo contendo L-DOPA, notamos, após leitura visual, que o isolado WM178 apresentou pigmentação semelhante quando comparado a R265 (Figura 10A), enquanto a linhagem WM779 teve baixa melanização e para os isolados WM161 e WM179 a produção do pigmento foi ausente (Figura 10A). Para *C. neoformans*, a linhagem WM148 apresentou maior pigmentação em relação a H99, já a linhagem WM629 teve uma melanização semelhante e os isolados WM628 e WM626 não melanizaram (Figura 10A). Além disso, avaliamos a atividade da lacase, pela quantificação espectrofotométrica (DO420nm) do pigmento produzido após exposição ao ABTS (Figura 10B). Em comparação com a estirpe R265, as culturas WM779, WM161 e WM179 mostraram uma atividade de lacase significativamente menor, a linhagem WM178 não apresentou diferença estatística na atividade da enzima (Figura 10B). Em relação a H99, as linhagens que não melanizaram apresentaram uma atividade de lacase significativamente menor, enquanto para as linhagens WM629 e WM148 a atividade da enzima foi maior (Figura 10B). Mas em geral, todas as linhagens que melanizaram apresentaram elevada atividade para a enzima lacase.

A atividade da urease também foi analisada para os isolados. Após a incubação de cada linhagem no caldo de ureia Roberts, a urease foi quantificada espectrofotometricamente (DO600nm) no sobrenadante. A atividade da enzima foi semelhante para todas as linhagens (Figura 10C).

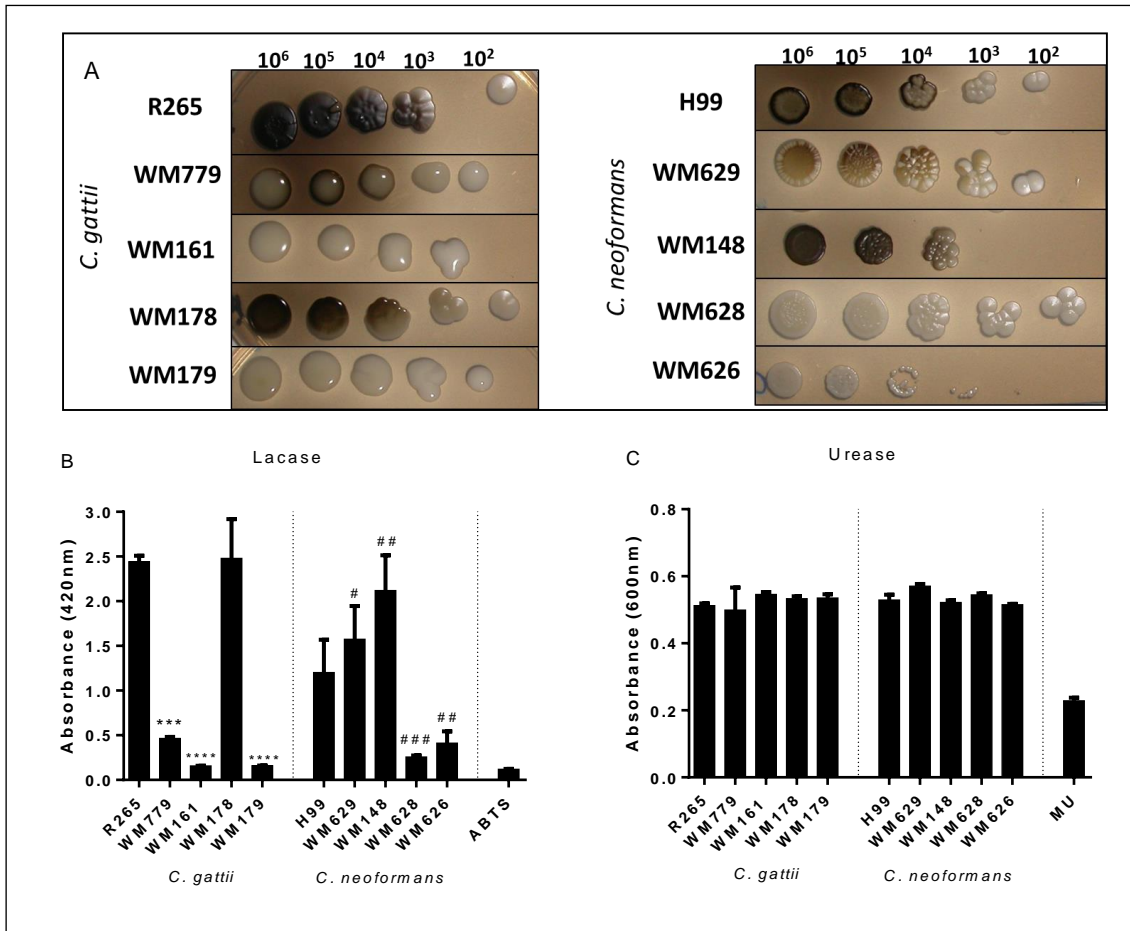


Figura 10. Caracterização do fenótipo de melanização e quantificação das enzimas lacase e urease. Fenótipo de melanização em MM_s suplementado com L-dopa, após 7 dias de incubação a 37°C (A). Quantificação da enzima lacase em MM_L após 72 horas (B). Atividade da enzima urease, as células foram incubadas em Roberts ureia broth; após 4 horas de incubação, a densidade óptica do sobrenadante foi mensurada a 600 nm (C). **Análise estatística:** o número de símbolos representa o nível de significância estatística para o valor de p; sendo assim: 1= p<0,05, 2 = p<0,01, 3=p<0,001, 4= p<0,0001. * Em relação a linhagem R265; # Em relação a linhagem H99 no MM_L.

5.2 Caracterização da virulência em modelo animal

Variações fenotípicas relacionadas aos fatores de virulência de *Cryptococcus* foram observadas para todas as linhagens analisadas e comparadas a R265 para *C. gattii*, e H99 para *C. neoformans*. Portanto, para inferir se essa diversidade fenotípica estava diretamente relacionada à virulência, nós infectamos camundongos com os diferentes isolados e avaliamos os seguintes parâmetros: letalidade, comportamento pelo protocolo SHIRPA, carga fúngica em órgãos alvos e alterações morfológicas após diferentes tempos de infecção.

5.2.1 Perfil de letalidade em modelo murino

Diferenças no perfil de letalidade foram observadas para todas as linhagens. A partir das curvas nós vimos para o isolado WM779 ($L_{t50}=24$ dias) um perfil de letalidade precoce em relação a R265 ($L_{t50}=29$ dias), assim como, para a linhagem WM629 ($L_{t50}=23$ dias), onde notamos um perfil semelhante a H99 ($L_{t50}=22$ dias) (Figura 11A e B). As linhagens que evoluíram para uma letalidade um pouco mais tardia, entre 27 e 31 dias (R265 e WM628) foram consideradas como intermediárias em relação ao perfil de letalidade (Figura 11A e B). Contudo, ao avaliar o comportamento dos animais após a infecção, por meio do protocolo SHIRPA, observamos que todas as linhagens foram capazes de induzir alterações nos domínios avaliados (Tônus e força muscular, estado neuropsiquiátrico, função autônoma, comportamento motor, função e reflexo sensorial) a partir do 10º dia de infecção. Entretanto, apesar das alterações comportamentais iniciarem em momentos semelhantes; para as linhagens com mortalidade precoce e intermediária nós observamos uma evolução mais aguda da doença; dessa forma, nós as classificamos como hipervirulentas (H) ($L_t=21 - 27$ dias) e virulentas (V) ($L_t=28 - 32$ dias), respectivamente (Figura 11C, D, E, F, G e H).

Para WM178 ($L_{t50}=40$ dias) e WM179 ($L_{t50}=41$ dias) observou-se uma letalidade mais tardia quando comparadas a R265 ($L_{t50}=29$ dias) (Figura 10A), perfil também observado para a linhagem WM148 ($L_{t50}=32$ dias) em relação a H99 ($L_{t50}=22$ dias) (Figura 11B). Para essas linhagens, onde vimos uma morbimortalidade tardia em relação aos controles positivos de virulência (R265-*C. gattii* e H99-*C. neoformans*) nós as classificamos como pouco virulentas (PV) ($L_t=27 - 45$ dias) (Figura 11A e B). Além disso, as cepas WM161 – *C. gattii* e WM626 – *C. neoformans*, embora induzem mudanças comportamentais no início da infecção, não foram capazes de levar a letalidade (Não letal – NL) dos camundongos, funcionando então, como controles negativos de virulência para cada espécie (Figura 11A, B, C, D, E, F, G e H).

Em geral, as diferenças estatísticas observadas nos domínios do protocolo Shirpa refletem a progressão da doença. Para as linhagens hipervirulentas e virulentas há uma evolução rápida da doença após o 10º dia da infecção, levando a uma área sob a curva menor em relação aos outros perfis de virulência. Por outro lado, as linhagens pouco virulentas ou não letais têm-se uma morbimortalidade crônica ou ausente, levando a extensão da curva nos diferentes parâmetros do SHIRPA, portanto uma área sob a curva maior. Mas vale ressaltar, que apesar da curva apresentar-se maior para as linhagens pouco virulentas, as alterações comportamentais são semelhantes às linhagens hipervirulentas ou virulentas, a diferença que se tem está associada à intensidade dos sinais clínicos de acordo com o tempo em que essas alterações ocorrem, para algumas linhagens mais precoce e para outras mais tardia.

5.2.2 Determinação da carga fúngica em órgãos alvos

Após determinação do perfil de letalidade e avaliação das alterações comportamentais na progressão da doença, foi avaliado também, a influência da carga fúngica na mortalidade dos animais. Para isso, animais previamente infectados, foram eutanasiados após 10 dias de infecção para determinação de UFC no lavado broncoalveolar, pulmão, baço e cérebro. Considerando a doença pulmonar, sítio inicial da infecção, a carga fúngica recuperada no lavado e no pulmão para a linhagem hipervirulenta, WM779, foi significativamente maior em relação a R265, para as linhagens H99 e WM629, também hipervirulentas, a quantidade de UFC recuperada foi semelhante (Figura 12A e B). Por outro lado, as linhagens pouco virulentas, WM178 e WM179, tiveram carga fúngica significativamente menor no pulmão em relação a linhagem controle R265, apesar de no lavado, apresentarem uma quantidade de UFC/g maior ou semelhante, respectivamente (Figura 12A e B). Em *C. neoformans*, para o isolado pouco virulento WM148, observou-se uma carga fúngica significativamente diminuída no pulmão e lavado quando comparado a H99 (Figura 12A e B). Para a linhagem WM626, não letal, nós recuperamos uma quantidade de UFC significativamente menor no lavado e pulmão, em relação a todas as linhagens de *C. neoformans* (Figura 12A e B). Entretanto, para *C. gattii*, a carga fúngica recuperada no 10º dia após infecção para a linhagem WM161 (Figura 12A e B) não foi suficiente para justificar a não letalidade observada para a mesma, sugerindo que a redução da carga fúngica para essa linhagem possa ocorrer em outros períodos não analisados nesse

estudo. Outra hipótese seria a capacidade dessa linhagem de induzir uma doença mais crônica e com menor perfil de reação inflamatória, mesmo com uma alta carga fúngica pulmonar.

Considerando a capacidade de *Cryptococcus* em disseminar via hematogênica, acometer o baço, e ultrapassar a barreira hematoencefálica, atingindo o cérebro, nós não recuperamos UFC para nenhum dos isolados de *C. gattii* no baço (Figura 12C), porém, no cérebro detectamos carga fúngica para todas as linhagens, com exceção da linhagem pouco virulenta WM179 (Figura 12D). Para *C. neoformans*, somente as linhagens WM626 e WM628 foram detectadas no baço, enquanto no cérebro, detectamos apenas para os isolados H99 e WM628 (Figura 12C e D).

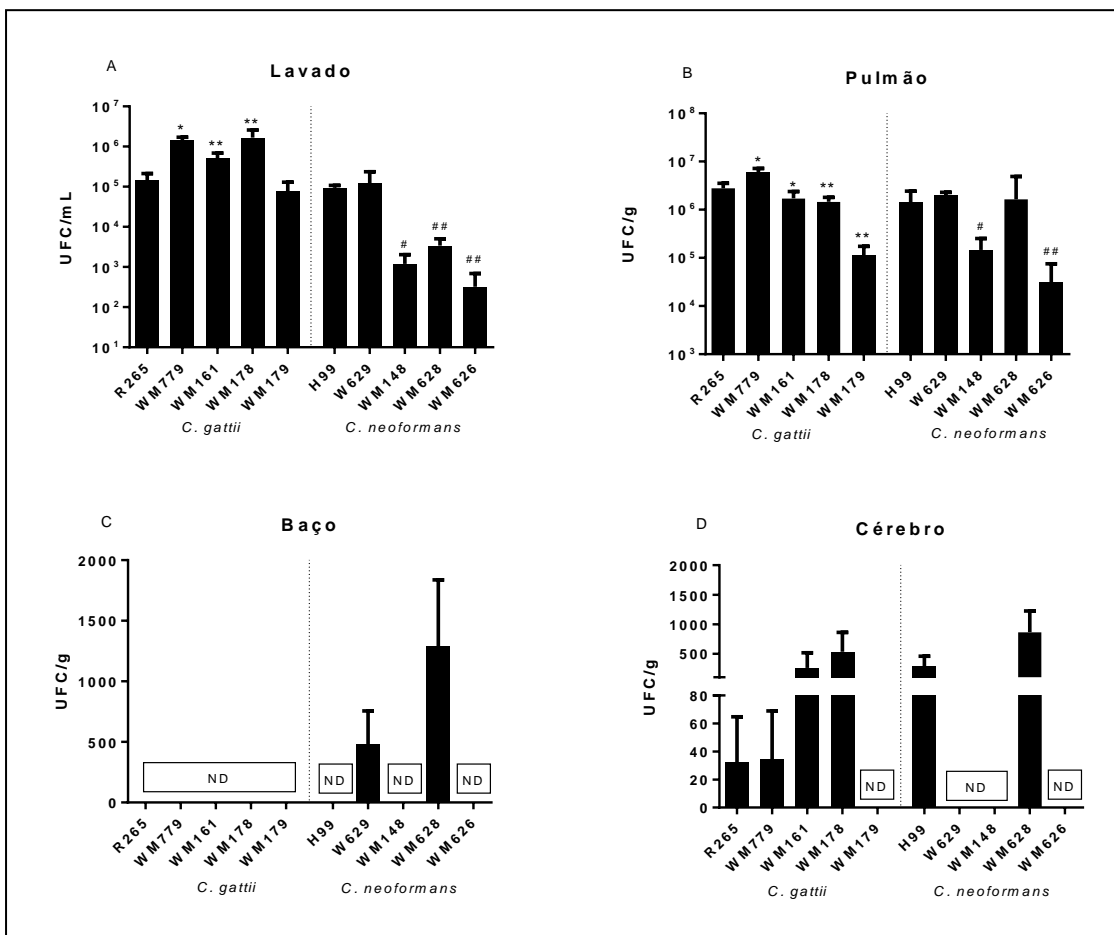


Figura 12. Avaliação da carga fúngica no lavado, pulmão, baço e cérebro para as diferentes linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans* após 10 dias de infecção intratraqueal. Determinação de UFC/mL no lavado (A) e UFC/g no pulmão (B), baço (C) e cérebro (D) após 10 dias de infecção. **Análise estatística:** o número de símbolos representa o nível de significância estatística para o valor de p; sendo assim: 1= p<0,05 e 2 = p<0,01. * Em relação a linhagem R265; # Em relação a linhagem H99. ND, não detectado.

5.2.3 Alterações morfológicas de *C. gattii* e *C. neoformans* *in vivo*

Considerando os dados já apresentados, nas análises *in vitro* nós vimos que a morfologia de *Cryptococcus* pode variar de acordo com a condição de cultivo, e dependendo da linhagem, pode levar a formação de células irregulares. Dessa forma, nós resolvemos investigar como esses eventos ocorreriam durante a infecção e se possíveis variações morfológicas poderiam estar relacionadas com o perfil de virulência e com a transmigração para o sistema nervoso central. Portanto, para essa análise, inicialmente foram escolhidas as seguintes linhagens: *C. gattii* – WM779 (hipervirulenta - H), R265 (virulenta - V), WM179 (pouco virulenta - PV) e WM161 (não letal - NL), *C. neoformans* – H99 (hipervirulenta - H), WM628 (virulenta - V), WM148 (pouco virulenta - PV) e WM626 (não letal - NL). Além disso, para esse ensaio nós utilizamos um inóculo acima do utilizado na sobrevivência e análise de UFC; a escolha de um inóculo maior procedeu-se ao considerarmos o ciclo de replicação de *Cryptococcus*, e o fato de trabalhos prévios demonstrarem transmigração para o SNC somente após 12 horas de infecção com inóculo de 1×10^6 cels/30 μ l (Santos *et al.*, 2014). Como queríamos avaliar a morfologia em tempos iniciais da infecção e sua possível influência na transmigração para o cérebro, foi estabelecido um inóculo de 1×10^7 cels/30 μ l, previamente cultivado em meio ASD, pois foi o meio em que as células tiveram menos variação morfológica.

Para tanto, animais foram infectados e eutanasiados 6, 24 ou 240 horas após infecção, sendo determinada a morfologia diretamente do tecido macerado (lavado e pulmão) e a carga fúngica no cérebro. Por limitações experimentais (baixa carga fúngica e o caráter lipídico do cérebro que dificulta a visualização no Nanquin) não foi possível visualizar e avaliar a morfologia de células presentes no cérebro.

De forma muito interessante, ao avaliar a morfologia diretamente do lavado e pulmão, nós vimos um padrão de modificação morfológica de todas as linhagens, em que as células apresentaram redução no diâmetro total e do corpo celular logo após 6 horas de infecção em relação ao inóculo inicial, representado pelo tempo 0 (Figura 13A, B, D e E). Isso sugere que as linhagens sofrem adaptações morfológicas logo no início da infecção como possível estratégia de sobrevivência ao contexto do hospedeiro. Em relação à cápsula polissacarídica, as variações ocorrem linhagem dependente, tanto para *C. gattii* quanto para *C. neoformans* (Figura 13C e F).

No entanto, para as linhagens de *C. neoformans* WM148 (PV) e WM626 (NL) observou-se no tempo de 6 horas um diâmetro celular e razão E_c/r_c significativamente menores no LBA quando comparadas a linhagem hipervirulenta H99, demonstrando incapacidade em promover aumento capsular (Figura 13C e F). Essas mesmas linhagens apresentaram um diâmetro celular significativamente maior no LBA e pulmão após 24h, porém com um corpo celular significativamente menor e razão E_c/r_c semelhante em relação a H99 (Figura 13A, B, C, D, E e F). Isso nos permite inferir que no tempo de 24 horas essas linhagens conseguem reduzir o seu corpo celular e aumentar a cápsula polissacarídica, ao ponto em que a proporção de casula em relação ao corpo celular fica semelhante à linhagem H99. Após 240 h (10 dias) de infecção, a linhagem não letal WM626 continua com um diâmetro celular e corpo celular significativamente menor no LBA e pulmão em relação a H99, confirmando a manutenção do fenótipo e sua influência para a não letalidade (Figura 13A, B, D e E).

No tempo de 24 horas, as linhagens H99 (H) e WM628 (V) apresentaram um aumento evidente no diâmetro do corpo celular no LBA, sugerindo a formação de células titânicas e demonstrando que este parâmetro pode estar diretamente relacionado à virulência dessas linhagens (Figura 13B). De forma global, observamos para *C. neoformans* que as alterações na morfologia celular durante a infecção, ocorrem em tempos diferentes dependendo da linhagem, e que o aumento no corpo celular e na cápsula polissacarídica são determinantes na virulência. Para *C. gattii*, apesar dos diferentes perfis de virulência, as linhagens seguem um padrão semelhante nas alterações morfológicas ao longo da infecção; somente após 240 h (10 dias) de infecção algumas linhagens (WM779 e WM161) apresentaram diferença estatística em relação a R265 para o diâmetro celular e razão E_c/r_c (Figura 13A, C, D e F). Apesar das variações morfológicas observadas para *C. gattii*, não foi possível estabelecer a mesma relação direta com a virulência como aquela observada para *C. neoformans*.

Além da variação morfológica, nós vimos que o aumento da carga fúngica no cérebro também foi determinante para a virulência. Ao avaliar a transmigração para o SNC, nós vimos que o fungo foi capaz de migrar para o cérebro logo após 6 horas de infecção, com exceção das linhagens R265 e H99, onde esse evento foi identificado a partir de 24 horas (Figura 13G e H). Considerando que no início da infecção temos células menores no pulmão, acreditamos que esse fator pode favorecer a saída do fungo do parênquima pulmonar e também a passagem através da barreira hematoencefálica.

Porém, não foi possível determinar se esse aumento é decorrente da capacidade de proliferação das células que chegam logo no início da infecção ou se ele está associado a maior transmigração durante a progressão da doença.

Assim como as linhagens apresentaram diferenças morfológicas de acordo com o contexto nutricional reproduzido nas análises *in vitro*, nós vimos *in vivo*, que dependendo do sítio em que o fungo se encontra (LBA ou pulmão), também se tem uma morfologia distinta. Para *C. gattii*, observamos logo após 24 horas de infecção diferenças significativas no diâmetro celular e na razão E_c/r_c , ambos parâmetros são aumentados no lavado em relação ao pulmão (Figura 14A, C). Após 240 horas (10 dias) todos os parâmetros morfológicos analisados permanecem aumentados no lavado em relação ao pulmão, com exceção do corpo celular que se mantém semelhante em ambos os sítios (Figura 14A, B.e C). Para *C. neoformans* essas diferenças morfológicas, conforme o local da infecção, ocorrem somente após 10 dias de infecção, onde o diâmetro celular e corpo celular são significativamente maiores no lavado em relação ao pulmão. Entretanto, a espessura capsular é semelhante entre os sítios, porém, no pulmão se tem uma razão E_c/r_c estatisticamente maior do que no lavado (Figura 14A, B, C e D).

Conforme nossos resultados, acreditamos que no início da infecção, o epitélio alveolar funciona com uma contenção para a passagem de células maiores, dessa forma, somente as células menores conseguem ultrapassar o epitélio alveolar e acessar o parênquima pulmonar, ocorrendo uma espécie de filtro para as células de *C. gattii* logo no início da infecção. Entretanto, o mesmo não foi observado para *C. neoformans*, uma vez que as células das linhagens que compõe esse estudo, se apresentam menores logo no início da infecção e não ficariam retidas no LBA. Sendo assim, esse filtro inicial na infecção pode ser um fator determinante para a seleção de células com tamanho menor e que, portanto, estariam mais aptas a ultrapassar outras barreiras como a hematoencefálica, fato que então pode propiciar o acesso ao sistema nervoso central, levando a meningoencefalite. Esses achados são compatíveis com estudos clínicos que apontam que a espécie *C. neoformans* está mais associada à meningoencefalite em comparação com *C. gattii* (Ngamskulrunroj et al., 2012). Mas é importante ressaltar que a morfologia é apenas um dos fatores que podem influenciar na transmigração para o SNC, outros aspectos também devem ser considerados, como tamanho do inóculo da infecção e expressão de fatores de virulência capazes de alterar a permeabilidade da barreira hematoencefálica (Figura 14D).

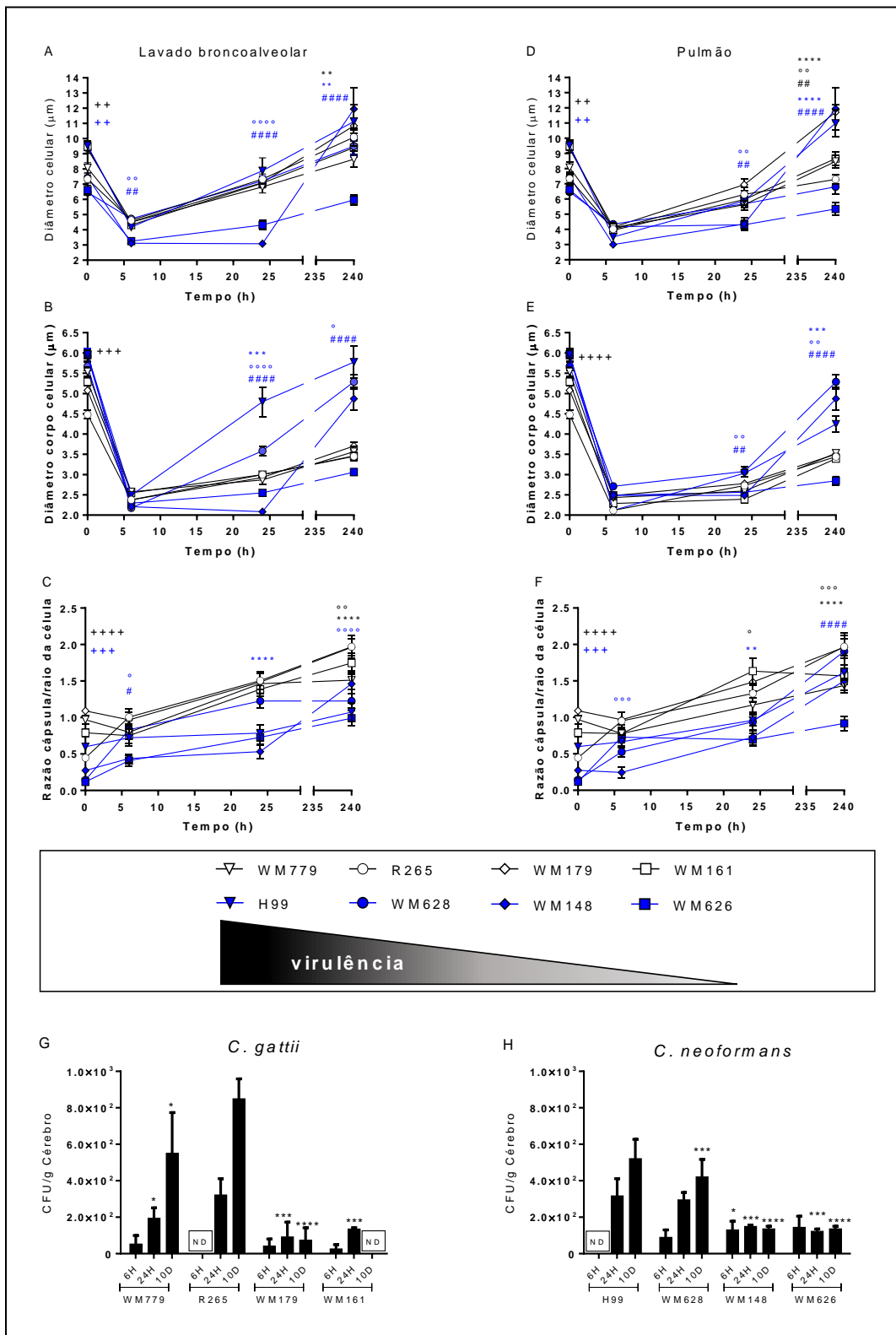


Figura 13. Determinação da morfologia no lavado (A), (B) e (C) e pulmão (D), (E) e (F) para as linhagens de *C. gattii* (WM779, R265, WM179 e WM161) representadas em branco e *Cryptococcus neoformans* (H99, WM628, WM148, WM626) representadas em azul, após 6, 24 e 240 horas de infecção. Cinética da carga fúngica no cérebro para as linhagens de *C. gattii* (G) e *C. neoformans* (H) após 6, 24 horas e 10 dias. **Análise estatística:** o número de símbolos representa o nível de significância estatística para o valor de p; sendo assim: 1= p<0,05, 2= p<0,01, 3=p<0,001, 4= p<0,0001. Os símbolos em preto representam as diferenças observadas entre as linhagens de *C. gattii*, enquanto os símbolos em azul representam as diferenças observadas entre as linhagens de *C. neoformans*. + Todas as linhagens de *C. gattii* em relação a linhagem R265 no tempo zero; + Todas as linhagens de *C. neoformans* em relação a linhagem H99 no tempo zero; # Linhagem WM179 em relação a R265; *Linhagem WM779 em relação a R265; °Linhagem WM161 em relação a R265; # Linhagem WM626 em relação a H99; *Linhagem WM628 em relação a H99; °Linhagem WM178 em relação a H99.

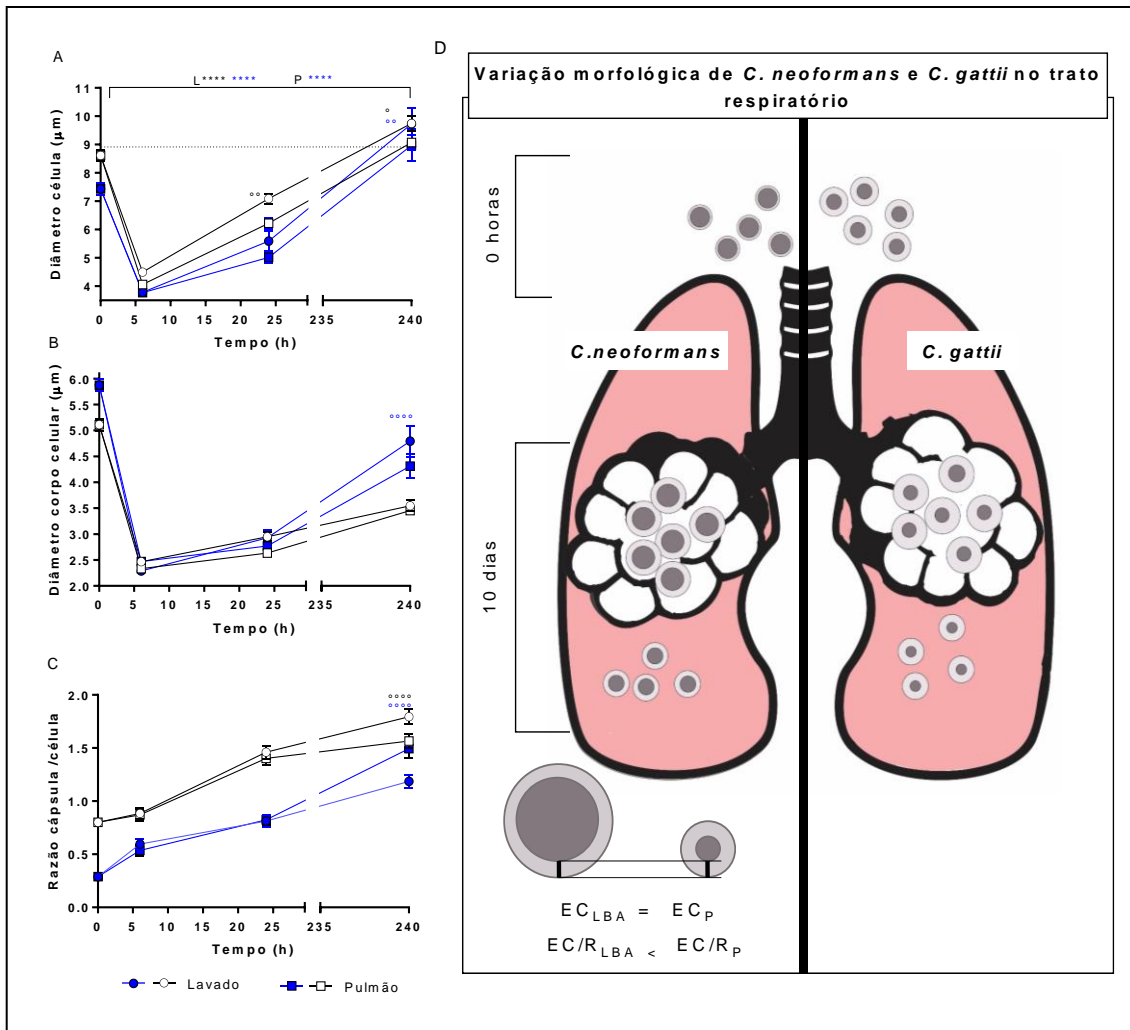


Figura 14. Determinação da variação morfológica de *C. gattii* e *C. neoformans* de acordo com o sítio da infecção, lavado ou pulmão (A), (B) e (C) após 10 dias de infecção. Representação esquemática das variações morfológicas para cada espécie (D). Nos gráficos, as linhas em azul representam a espécie *C. neoformans*, enquanto as linhas em preto *C. gattii*. A linha pontilhada no gráfico (A) demonstra a semelhança no diâmetro total da célula de *C. gattii* em relação a *C. gattii* e *C. neoformans* no pulmão após 10 dias de infecção. EC_{LBA} : Espessura capsular no lavado brocoaveolar; EC_P : Espessura capsular no parênquima pulmonar. **Análise estatística:** o número de símbolos representa o nível de significância estatística para o valor de p; sendo assim: *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ****: $p < 0,0001$. Os símbolos em preto representam as diferenças observadas para a espécie *C. gattii*, enquanto os símbolos em azul representam as diferenças observadas para *C. neoformans*. L* Em relação a morfologia inicial para *C. gattii* no lavado e após 10 dias de infecção; L* Em relação entre a morfologia inicial para *C. neoformans* no lavado e após 10 dias de infecção; P* Em relação entre a morfologia inicial para *C. gattii* no pulmão e após 10 dias de infecção; ° Em relação a morfologia de *C. gattii* no lavado e no pulmão; ° Em relação a morfologia de *C. neoformans* no lavado e pulmão.

É interessante notar, que no pulmão após 10 dias de infecção, temos uma célula (*C. gattii* e *C. neoformans*) com tamanho semelhante ao inóculo inicial de *C. gattii*, porém, ao consideramos as mudanças na espessura da cápsula e o diâmetro do corpo celular, nós vimos que as células são completamente distintas, inicialmente temos uma célula com um corpo celular maior e cápsula menor, enquanto 10 dias após infecção

ocorre o oposto, temos uma célula com um corpo celular menor e cápsula maior (Figura 14A). Ao comparar a morfologia das espécies *in vivo*, notamos que inicialmente *C. neoformans* apresenta uma célula menor em relação a *C. gattii*, mas, que se iguala após 6 horas de infecção (Figura 14A). Em sequência, voltamos a observar diferenças no tamanho total da célula entre *C. neoformans* e *C. gattii* após 24 horas de infecção, onde a primeira volta a ficar significativamente menor em relação a *C. gattii*. Surpreendentemente, após 10 dias de infecção, o tamanho das células é semelhante conforme cada sítio da infecção. No entanto, apesar das diferenças e semelhanças observadas conforme o tempo da infecção, é importante ressaltar que embora o tamanho total da célula seja diferente ou semelhante, a composição da célula é completamente diferente entre as espécies, podendo haver maior (*C. gattii*) ou menor (*C. neoformans*) cápsula polissacarídica (Figura 14A, B, C e D).

5.2.3 Alterações na espessura capsular de *C. gattii* e *C. neoformans*: do *in vitro* ao *in vivo*

Em suma, nós vimos que a espessura capsular de *C. gattii* e *C. neoformans* pode variar conforme a condição de cultivo *in vitro*, e que essas variações nem sempre corroboram com o que ocorre *in vivo*.

Para *C. gattii*, a linhagem WM179 apresentou espessura capsular com média significativamente maior em relação às linhagens (WM779, R265 e WM161) no meio MML e SDL, entretanto no MML+SFB10% a linhagem WM779 sobressaiu-se com média significativamente maior. Na condição *in vivo* essa variação foi dependente do tempo e sítio (Lavado ou pulmão) da infecção, mas após 240 horas (10 dias) de infecção, nós vimos que a linhagem WM179 apresentou espessura capsular com média significativamente maior em relação às outras linhagens; mas apesar disso, esse fator não foi determinante para virulência da linhagem (Tabela 7). É possível que, para essa linhagem, a resposta inflamatória tenha sido mais determinante para a letalidade, uma vez que a mesma também apresentou carga fúngica reduzida no pulmão e lavado em relação a R265.

Para *C. neoformans*, a linhagem H99 apresentou no SDL espessura capsular com média significativamente maior em relação às linhagens WM628, WM148 e WM626, mas no MML as linhagens WM628 e WM628 se destacaram com espessura capsular

maior. Enquanto no MM_L+SFB10% somente a linhagem WM626 apresentou média maior em relação às outras linhagens de *C. neoformans*. Ao analisar a espessura capsular *in vivo*, nós observamos que a espessura capsular variou de acordo com o tempo de infecção, mas é interessante notar que a linhagem hipervirulenta H99 e virulenta WM628 apresentaram espessura capsular com média significativamente maior em relação à linhagem pouco virulenta WM148 e não letal WM626. A linhagem WM148 apresentou um aumento significativamente maior na espessura capsular somente após 240 horas (10 dias) de infecção. Nós acreditamos que esse aumento tardio, *in vivo*, na espessura capsular, pode ter refletido no atraso da letalidade observado para a linhagem (Tabela 8).

Dessa forma, o aumento na espessura capsular ao longo da infecção, para *C. neoformans*, sugere ser um fator determinante na virulência da linhagem, o que não é válido para *C. gattii*, segundo os nossos resultados.

Tabela 7. Variação da espessura capsular das linhagens de *C. gattii* de acordo com as condições experimentais *in vitro* e *in vivo*; e perfil de letalidade em modelo murinho de infecção intratraqueal.

		Espessura capsular (μm) por linhagem de <i>C. gattii</i>							
		WM779 VGIV		R265 VGII		WM179 VGI		WM161 VGIII	
Condição <i>in vitro</i>		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
	SD _L	2,00	0,85	1,17	0,35	2,66	1,29	2,03	0,66
	MM _L	3,18	1,02	2,17	0,66	3,27	1,34	2,55	0,77
	MM _L +SFB10%	5,07	1,41	3,40	0,97	4,63	0,82	3,85	0,90
Condição <i>in vivo</i>									
Lavado	6h	0,97	0,28	1,12	0,34	1,07	0,31	0,88	0,34
	24h	1,99	0,50	2,16	0,48	2,08	0,54	2,03	0,43
	240 h	2,55	0,68	3,32	0,86	3,56	0,72	2,97	0,70
Pulmão	6h	0,85	0,32	0,95	0,33	0,83	0,35	0,82	0,34
	24h	1,50	0,42	1,78	0,62	2,08	0,56	1,78	0,49
	240 h	2,50	0,60	2,37	0,97	4,10	0,96	2,63	0,68
Letalidade (dias)		25,2	1,64	28,2	1,64	42	2,36	> 100	-

VIRULÊNCIA

DP: Desvio padrão; SD_L: Sabouraud dextrose líquido; MM_L: Meio mínimo líquido; MM_L+SFB10%: Meio mínimo líquido suplementado com soro fetal bovino 10%.

Tabela 8. Variação da espessura capsular das linhagens de *C. neoformans* de acordo com as condições experimentais *in vitro* e *in vivo*; e perfil de letalidade em modelo murino de infecção intratraqueal.

		Espessura capsular (μm) por linhagem de <i>C. neoformans</i>							
		H99 VNI		WM628 VNIII		WM148 VNI		WM626 VNII	
Condição <i>in vitro</i>		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
SD _L		1,79	0,35	0,39	0,29	0,78	0,27	0,32	0,26
MM _L		1,19	0,37	1,33	0,49	0,67	0,24	1,36	0,28
MM _L +SFB10%		1,38	0,48	1,04	0,60	0,51	0,29	1,52	0,34
Condição <i>in vivo</i>									
Lavado	6h	0,84	0,38	0,86	0,22	0,45	0,21	0,48	0,26
	24h	1,54	0,42	2,11	0,48	0,50	0,20	0,88	0,35
	240 h	2,67	1,04	3,25	1,15	3,53	1,67	1,45	0,46
Pulmão	6h	0,69	0,26	0,67	0,24	0,24	0,27	0,84	0,40
	24h	1,42	0,39	1,34	0,46	0,93	0,69	0,86	0,36
	240 h	3,32	1,18	1,90	0,87	3,53	1,67	1,25	0,47
Letalidade (dias)		23	1,67	27,8	2,22	32,2	4,98	> 100	-

VIRULÊNCIA

DP: Desvio padrão; SD_L: Sabouraud dextrose líquido; MM_L: Meio mínimo líquido; MM_L+SFB10%: Meio mínimo líquido suplementado com soro fetal bovino 10%.

6. DISCUSSÃO

Cryptococcus gattii e *C. neoformans* são microrganismos ubíquos, importantes patógenos ambientais envolvidos na pneumonia e meningoencefalite criptocócica. *C. neoformans* se destaca pela elevada prevalência em meningite criptocócica (220.000 novos casos anualmente no mundo) e alta taxa de letalidade (81%) (Rajasingham *et al.*, 2017). Em estudos publicados de diferentes países (Austrália; Papua Nova Guiné; Colúmbia Britânica, Canadá; EUA), a taxa de mortalidade de infecções por *C. gattii* varia de 13 a 33% (Lalloo *et al.*, 1994; Galanis *et al.*, 2010; Harris *et al.*, 2011; Harris *et al.*, 2013). A virulência desse microrganismo reflete a sua habilidade em se adaptar de forma específica frente às diferentes pressões ambientais e do hospedeiro (Ballou e Johnston, 2017).

No ambiente, *Cryptococcus* é encontrado no solo, plantas em decomposição, excreta de pombos ou associado a outros microrganismos como amebas de vida livre e nematoides (Bahn *et al.*, 2007; May *et al.*, 2016). Contudo, considerando os diferentes nichos ecológicos em que esse microrganismo pode ser encontrado, ao longo da sua evolução, *Cryptococcus* passou por diversas pressões ambientais (stress nutricional, osmótico, pH, temperatura, fagocitose por amebas, etc), que o tornaram virulento em animais, sem a necessidade de replicar e sobreviver nesses hospedeiros previamente (May *et al.*, 2016). Esse fenômeno é denominado como virulência “pronta”, que é orquestrado frente a estímulos ambientais e que repercute na sobrevivência no ambiente e durante a infecção, permitindo a dualidade de nichos em que *Cryptococcus* pode ser encontrado (Casadevall *et al.*, 2003). Considerando esses aspectos, nesse trabalho, buscamos caracterizar linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans* quanto aos diferentes fenótipos de virulência *in vitro* (cápsula polissacarídica, pseudofilamentação/filamentação, melanização, lacase e urease) e demonstrar como esses fatores podem influenciar na virulência em modelo murino. Dessa forma, foi possível compreender melhor a influência da diversidade fenotípica/biológica de *Cryptococcus* na interação com o hospedeiro, além de entender que alguns aspectos ocorrem linhagem dependente e que alterações observadas *in vitro*, não necessariamente ocorrem *in vivo*.

A determinação do crescimento frente a diferentes situações nutricionais evidenciou para ambas as espécies, que a maioria das linhagens cresce melhor na condição de cultivo pobre em nutrientes, MML (Figura 5 e 6). O fato chama a atenção,

uma vez que se esperava o oposto, melhor crescimento nos meios ricos em nutrientes, SD_L e RPMI. Nós vimos que no meio mínimo a célula apresenta uma razão superfície maior em relação ao meio SD_L. No entanto, a nossa hipótese, é que nessa condição a célula sofre modificações na sua morfologia que permitem a otimização do seu gasto energético. A célula apresenta um tamanho menor e isso repercute em um gasto energético menor e em contrapartida, um maior *fitness* reprodutivo. Em situações onde há uma maior quantidade de nutrientes, como no meio SD_L e RPMI, a célula mantém o seu metabolismo normal, sem sofrer mudanças na sua morfologia, fazendo com que a célula tenha um gasto energético maior e uma menor replicação. Esses resultados indicam a flexibilidade adaptativa de *Cryptococcus* a nichos com pouca disponibilidade de nutrientes, como excretas de pombos e tecidos do hospedeiro. E provavelmente flexibilidade metabólica, o que ainda será avaliado por proteômica e Qrt-PCR.

É interessante observar, também, a importância da temperatura no crescimento. A temperatura de 37°C possibilitou para a maioria das linhagens um crescimento maior no MM_L (Figura 5 e 6). Isso indica que a soma de fatores estressores para a célula, como temperatura e nutrição, pode potencializar o crescimento de *Cryptococcus*. Mas, algumas linhagens podem ser mais sensíveis a mudança de temperatura, como para a linhagem WM628, onde a 37°C observamos um crescimento significativamente menor no MM_L em relação a temperatura de 28°C (Figura 5C). No entanto existem algumas exceções para os aspectos discutidos, a linhagem WM779, por exemplo, apesar de apresentar mudanças na sua morfologia quando cultivada no meio mínimo, apresentou crescimento semelhante ao SD_L a 37°C (Figura 6A). Nesse caso, entretanto, nós vimos que no meio MM_L a célula possui uma cápsula 3,5 vezes maior em relação ao raio do corpo celular (Figura 8C). No entanto, nós acreditamos que, apesar da razão S/V ser maior no MM_L em relação ao SD_L a 37°C, a manutenção/formação da cápsula polissacarídica pode aumentar o gasto energético da célula, fazendo com que a linhagem tenha um perfil de crescimento semelhante ao observado no SD_L (Figura 7F).

As alterações morfológicas são modificações determinantes para a sobrevivência de *Cryptococcus* no ambiente e no hospedeiro. A filamentação, por exemplo, está associada a uma melhor absorção de nutrientes no ambiente (Klein e Tebbets, 2007; Phadke *et al.*, 2013; Wang e Lin, 2015), além de permitir a evasão da fagocitose por amebas, um importante predador ambiental (Lin *et al.*, 2015; Wang e Lin, 2015). Mas no hospedeiro, essa morfologia não é benéfica para o fungo, uma vez que a reposta

imune é mais efetiva nessa fase, além de que, na condição de filamentoso, *Cryptococcus* é mais sensível ao aumento da temperatura (Fromtling *et al.*, 1979; Smith *et al.*, 2003; Wang e Lin, 2015). Por outro lado, durante a infecção, a cápsula polissacarídica da levedura exerce um papel fundamental na resistência ao estresse oxidativo, evasão da fagocitose por macrófagos, termotolerância, entre outros (Zaragoza *et al.*, 2008; Li e Mody, 2010). No entanto, a capacidade de reconhecer os estresses do meio e responder de forma específica, torna *Cryptococcus* capaz de sofrer alterações morfológicas e sobreviver conforme o contexto em que se encontra (Casadevall *et al.*, 2003). Essa adaptação morfológica fica clara, quando nós incubamos as linhagens em diferentes condições nutricionais e avaliamos a morfologia após 72 horas de incubação.

O presente estudo demonstrou que a espessura da cápsula e o diâmetro da levedura diferem ou se assemelham de uma linhagem para a outra dependendo da condição de cultivo (Figura 8). Para *C. gattii*, no meio SD_L e MM_L a linhagem WM179 genótipo VGI, apresentou em média, uma espessura capsular significativamente maior entre as linhagens, enquanto no meio MM_L + SFB10% a linhagem WMM779 - VGIV se sobressai com uma espessura capsular maior (Tabela 7). Estudos recentes relataram que linhagens de *C. gattii* do genótipo VGI apresentam cápsula significativamente maior em relação aos genótipos VGII e VGIII, quando crescidas por 5 dias a 37°C em meio Sabouraud diluído 20x em 50 mM de MOPS (Fernandes *et al.*, 2016). Apesar de no nosso estudo utilizarmos apenas uma linhagem de cada genótipo, o que reduz a nossa validação estatística, nosso resultado sugere que dependendo da condição de cultivo, as diferenças na espessura capsular podem não seguir um padrão entre os genótipos, o que levanta uma alerta sobre qual a melhor condição de cultivo *in vitro* para representar possíveis variações morfológicas que podem ocorrer no ambiente ou no hospedeiro.

Para esclarecer esse viés, nós também avaliamos a morfologia das células *in vivo*, no lavado e no pulmão, em diferentes tempos da infecção. Supreendentemente, nós vimos que nos tempos iniciais da infecção as linhagens apresentam uma espessura capsular semelhante, mas, após 10 dias, a linhagem WM179 - VGI prevalece com uma espessura capsular significativamente maior em relação às outras linhagens, corroborando os dados da literatura apontados anteriormente (Tabela 7). Contudo, esse aspecto não foi determinante para a virulência, uma vez que nas análises de letalidade a linhagem WM179 – VGI foi pouco virulenta e apresentou carga fúngica reduzida no pulmão e não detectável no cérebro após 10 dias de infecção (Figura 11A). Sendo

assim, de modo geral, não foi possível estabelecer uma relação direta entre o aumento da cápsula polissacarídica e a virulência para *C. gattii*; ao contrário de *C. neoformans* onde o aumento da cápsula ao longo da infecção foi determinante para a virulência.

Trabalhos prévios demonstraram em *C. gattii* que a estrutura do glucuronoxilmananas (GXM), principal componente da cápsula polissacarídica, pode sofrer desacetilação em um dos seus grupos O-acetil durante a infecção (Urai *et al.*, 2015). Essa desacetilação, reduz a capacidade de células dendríticas em liberar mediadores inflamatórios, permitindo a evasão da resposta imune (Urai *et al.*, 2015). Interessantemente, essa desacetilação não ocorre para *C. neoformans*, uma das justificativas pelas quais essa espécie é mais prevalente em pacientes imunossuprimidos e que reforça os nossos resultados, onde demonstramos que o tamanho da cápsula é importante para essa espécie. Dessa forma, nós acreditamos que apesar das semelhanças na espessura capsular, as linhagens de *C. gattii* podem apresentar adaptações distintas na estrutura da cápsula polissacarídica durante a infecção, o que pode interferir na sua virulência. Sendo assim, análises das fibras capsular e outros componentes da cápsula polissacarídica ainda serão realizadas para confirmar essa hipótese.

A cultura de WM779 crescida em MM_L a 37°C é capaz de formar pseudofilamentos nessa condição. Sendo assim, nós decidimos verificar como os componentes do MM_L poderiam influenciar no crescimento e na morfologia dessa linhagem (Figura 9A). Vimos que na ausência de glicina, magnésio e potássio havia uma redução significativa do crescimento das linhagens em relação ao MM_L padrão, sendo digno de nota, que na ausência de potássio ou quando o potássio e magnésio foram removidos simultaneamente, quase não se observou crescimento para a linhagem. O mesmo foi observado para a linhagem H99 utilizada como controle (Figura 9B).

A glicina, na microbiologia básica, é classificada com um fator de crescimento para os microrganismos (Madigan, 2004). Apesar da maioria dos microrganismos serem capazes de sintetizar esse elemento, alguns são auxotróficos, ou seja, é necessário a sua adição aos meios de cultura. Dessa forma, para a linhagem WM779 a ausência desse componente apenas reduziu o seu crescimento. Na via da glicólise, *Cryptococcus* é capaz de produzir esse aminoácido, porém a sua síntese gera maior gasto de ATP o que pode ter refletido no crescimento diminuído observado para a linhagem em estudo. Já o potássio e magnésio são macronutrientes essenciais para a manutenção de diversas

funções na célula, como atividade de enzimas, síntese de proteínas, estabilização de ribossomos, membranas celulares e ácidos nucleicos (Madigan, 2004). Apesar da influência desses micro e macro nutrientes no crescimento das células (Figura 9B), a ausência dos mesmos não foi capaz de induzir pseudofilamentação ou filamentação para a linhagem WM779.

C. neoformans é um fungo ambiental encontrado principalmente em fezes de pombos, nos quais as concentrações de glicose chegam até 0,1% do peso seco (Nielsen *et al.*, 2007). Outras espécies de *Cryptococcus*, como *C. gattii*, estão associados principalmente a solo e árvores, em que as concentrações de glicose variam significativamente: a concentração de glicose pode atingir até 0,5% em solo (Wang *et al.*, 2010) e pode variar de 0,1 a 0,4% em *Eucalyptus gunnii*, atingindo até 6% do tronco da árvore e peso seco da raiz de *Eucalyptus globulus* (Leborgne, 1995). Assim, quando inalado para o pulmão, ambos *C. neoformans* e *C. gattii* passam por um contexto de escassez de glicose (0,002% nos espaços alveolares) (Williams e Del Poeta, 2011).

Interessantemente, ao reduzir as concentrações de glicose *in vitro*, nós vimos que dependendo da concentração, a linhagem WM779 apresentava maior pseudofilamentação e formação de tubo germinativo, embora o mesmo não tenha ocorrido para a linhagem H99 (Figura 9D). Znf2 é um importante fator de transcrição associado a filamentação em *Cryptococcus* e a presença da glicose atua como um repressor desse fator transcricional (Lin *et al.*, 2015). Assim, isso sugere que para a WM779 esse fator de transcrição pode ser mais ativado com a redução de glicose e propiciar a formação de células irregulares, o que não é válido para a linhagem H99. Portanto, vimos que as linhagens WM779 e H99 se adaptam morfologicamente de maneira distinta na limitação de fonte de carbono (Figura 9D). Mas nesse contexto, a linhagem WM779 apresentou um crescimento significativamente reduzido em relação a H99 quando reduzimos a glicose para 50% e 25% em relação ao MM_L padrão (Figura 9C). Como a linhagem WM779 pseudofilamenta e produz tubo germinativo principalmente nessas condições, nós supomos que esse contexto venha acompanhado de uma redução no metabolismo, uma vez que fatores associados a vias de metabólicas para a contenção de energia podem estar ativados. Assim, acreditamos que essa redução no metabolismo, como estratégia adaptativa, implica no menor crescimento observado. Além disso é importante considerar que na forma filamentosa *Cryptococcus* é mais sensível a temperatura de 37°C (Wang e Lin, 2015), condição em que a WM779 foi

cultivada (Figura 9C). Já a linhagem H99, reduz o seu tamanho celular como estratégia adaptativa e dessa forma consegue otimizar o uso da glicose de forma mais eficiente que a linhagem WM779 (Figura 9C e D). Na presença de 12,5% de glicose há uma redução na formação de células irregulares para a linhagem WM779 e o seu crescimento fica semelhante a H99. Mas quando a fonte de carbono foi removida completamente, a linhagem H99 não foi capaz de crescer (Figura 9C e D).

Portanto, nós vimos que a pseudofilamentação e formação de tubo germinativo para a linhagem WM779 é dependente da concentração de glicose e que a linhagem H99 não replica na ausência da mesma. Porém, apesar de utilizarem, *in vitro*, estratégias de adaptação distintas, esse fator não está associado a virulência, uma vez que ambas as linhagens foram hipervirulentas, com média de letalidade de 25 dias. O perfil de filimentação também não foi observado *in vivo* para a linhagem WM779, o que nos permite inferir que a pseudofilamentação e formação de tubo germinativo, observada para linhagens em condições *in vitro* não implica necessariamente, na ocorrência dessa morfologia *in vivo*. No ambiente a filimentação e pseudofilamentação estão relacionadas a um baixo potencial de virulência, mas ao mesmo tempo, a capacidade de escape de predadores do ambiente; já a forma leveduriforme está envolvida na sobrevivência frente a estresses abióticos do ambiente e maior virulência no hospedeiro mamífero (Wang e Lin, 2015). Assim, o fato da linhagem WM779 não filimentar *in vivo*, reflete na sua plasticidade fenotípica, o que lhe oferece vantagens de sobrevivência tanto no hospedeiro animal quanto no ambiente.

A melanina é um pigmento importante para a virulência de *Cryptococcus*, que permite a resistência ao estresse oxidativo e apresenta propriedades imunomoduladoras que possibilitam o escape das respostas do hospedeiro (Casadevall *et al.*, 2000). Nossos achados demonstraram que as linhagens não letais WM161 (*C. gattii*) e WM626 (*C. neoformans*) não foram capazes de melanizar *in vitro* e apresentaram uma baixa atividade para a enzima lacase (Figura 10A e B). Entretanto, para as linhagens 628 (*C. neoformans*) e WM179 (*C. gattii*) onde observamos um perfil de virulência e pouca virulência, respectivamente; não visualizamos *in vitro* a produção do pigmento (Figura 10A e B, 11A e B). É interessante notar que a linhagem WM628 apresentou um aumento na espessura capsular logo após 24 horas de infecção quando comparada as outras linhagens, já para a linhagem WM179 esse aumento foi significativamente maior somente após 10 dias de infecção em relação às outras linhagens (Figura 13C e F).

Tendo em vista esses aspectos, nós supomos que o aumento na espessura capsular, ocorrido no início ou mais tardio a infecção, dependendo da linhagem, pode compensar a não melanização e refletir na virulência; fato que não ocorre para as linhagens que não melanizaram e não foram letais. A linhagem WM626 permanece com uma razão E_c/r significativamente menor ao longo da infecção em relação a linhagem hipervirulenta H99, e a WM161 (Figura 13C e F), apesar de apresentar uma razão semelhante a R265, não é capaz de melanizar (Figura 10A).

Estudo *in vivo* demonstrou que *C. neoformans* encápsulado e melanizado é menos fagocitado por macrófagos alveolares do que células encapsuladas e não melanizadas. Esse fenômeno é atribuído ao aumento da eletronegatividade da célula quando a mesma se encontra melanizada (Mednick *et al.*, 2005). Mas é importante compreender que, apesar de haver essa relação entre a cápsula e a melanina, a ausência do pigmento não é determinante para a virulência, conforme encontramos nesse estudo. Quando consideramos a virulência, nós acreditamos que, para algumas linhagens a cápsula polissacarídica pode ser mais importante do que a melanina, uma vez que, a ausência do pigmento pode ser compensada com um aumento dessa estrutura. Mas, de acordo com os nossos resultados, não foi possível demonstrar se o inverso ocorre. Entretanto, estudos prévios, já demonstraram que paradoxalmente, células de *C. neoformans* acápsuladas e que melanizam são mais fagocitadas do que as que não melanizam, mas esse fato ainda permanece pouco compreendido (Mednick *et al.*, 2005). Assim, para compreender melhor os nossos resultados e aprimora-los com a literatura, ensaios para a análise da melanização *in vivo* ainda devem ser realizados.

Ainda, sendo interessante observar, trabalhos prévios abordam a síntese de melanina como um fator associado ao tropismo para o sistema nervoso central (Mednick *et al.*, 2005). Mas, nós vimos que linhagens incapazes de melanizar *in vitro* podem atingir o SNC e proliferar nesse sítio. Na biologia, o tropismo de órgãos ou tecidos reflete a capacidade de um determinado patógeno em infectar um órgão específico ou conjuntos de órgãos (Mccall *et al.*, 2016). Polacheck (1990) demonstrou que *Cryptococcus neoformans* não é capaz de utilizar catecolaminas como única fonte de carbono e nitrogênio. Portanto, considerando esse fator, o cérebro não é um nicho nutricionalmente preferido para o crescimento de *Cryptococcus*. Ainda, nesse mesmo trabalho foi estabelecido um sistema oxidativo, em que se tinha epinefrina como doador de elétrons, Fe^{3+} como íon metal de transição catalítico e peróxido de hidrogênio como

acceptor de elétrons. Nesse sistema, foi demonstrado que a capacidade da levedura em utilizar a catecolamina, para a melanogênese, neutraliza os efeitos nocivos da sua oxidação, que ocorre na presença de peróxido de hidrogênio e íons de metais (Polacheck *et al.*, 1990). Mas, apesar desses achados da literatura, é importante entender que a melanização não é um fator crucial para a sobrevivência de *Cryptococcus* no SNC, uma vez que a levedura pode utilizar de outras estratégias para o escape do estresse oxidativo. Algo que vimos no nosso trabalho, onde linhagens incapazes de melanizar *in vitro* apresentam um aumento na cápsula polissacarídica *in vivo*. Em suma, nós supomos que a melanização, quando ocorre no SNC, está mais associada a uma consequência da chegada e adaptação ao SNC do que ao tropismo para o órgão em si. Para nós, o tropismo para o sistema nervoso central está mais envolvido com a capacidade de *Cryptococcus* em proliferar no interior de macrófagos e ultrapassar a Barreira Hematoencefálica (BHE), fenômeno que pode ser atribuído ao tamanho da célula, aumento da cápsula polissacarídica e atividade da enzima urease. O aumento da cápsula polissacarídica permite a sobrevivência no interior dos macrófagos e conseqüentemente favorece a ocorrência de transmigração via “Cavalo de Tróia” (Charlier *et al.*, 2009). A amônia produzida via ação da urease, por sua vez, pode danificar o endotélio do hospedeiro, e esse fator somado a presença de microcélulas, pode contribuir para maior transmigração da levedura em direção ao sistema nervoso central (SNC), paracitose (Charlier *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2010; May *et al.*, 2016).

Nesse trabalho, nós mostramos que a morfologia de *Cryptococcus* é extremamente variável de acordo com as condições de cultivo *in vitro* e *in vivo*. *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans* diferem quanto às alterações morfológicas; sendo o tamanho da cápsula mais associado à virulência de *C. neoformans*. Além disso, nós vimos, surpreendentemente, que determinadas alterações morfológicas como pseudofilamentação e formação de tubo germinativo, podem ser observadas *in vitro*, mas não necessariamente ocorrem *in vivo*. Novos trabalhos precisam ser conduzidos a fim de se entender como a estrutura da cápsula polissacarídica de *C. gattii* pode influenciar na virulência, e como é estabelecida a relação entre cápsula polissacarídica e melanização para ambas as espécies. Nós avaliamos a morfologia *in vitro* e em modelo murino, sendo demonstrado uma possível transição morfológica de *Cryptococcus* de condições laboratoriais para o hospedeiro (Figura 14). Assim, nosso próximo passo será mimetizar condições ambientais (infecção de mudas de eucalipto em diferentes situações, ainda a serem padronizadas) para avaliar a morfologia e aprimorar a compreensão de como ocorre a adaptação de *Cryptococcus* no ambiente, e se

essa adaptação é dependente da espécie ou linhagem em estudo (Figura 14). Com isso, será possível estabelecer modelos de transição morfológica para *Cryptococcus* seguindo as perspectivas do ambiente, condições laboratoriais e hospedeiro.

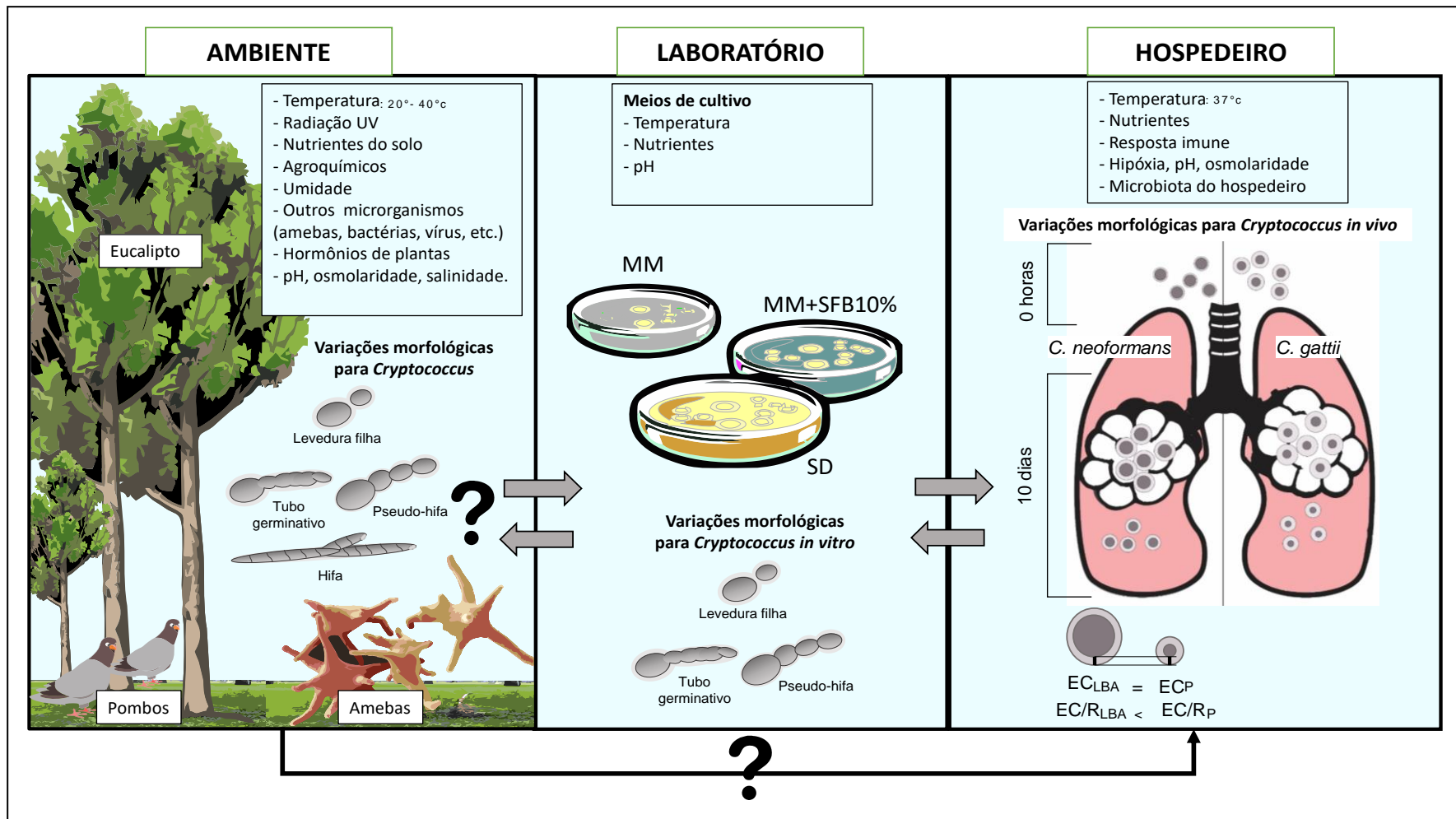


Figura 14: Fatores que podem influenciar a morfologia de *Cryptococcus* na perspectiva do ambiente, laboratório e hospedeiro. MM: Meio mínimo; MM+SFB10%: Meio mínimo suplementado com soro fetal bovino 10%, SD: Sabouraud dextrose; EC_{LBA} : Espessura capsular de leveduras derivadas do lavado broncoalveolar; EC_P : Espessura capsular de leveduras derivadas do pulmão; EC/R_{LBA} : Proporção da cápsula no lavado broncoalveolar em relação ao tamanho do corpo celular, EC/R_P : Proporção da cápsula no pulmão em relação ao tamanho do corpo celular. Os símbolos de interrogação representam os contextos em que a morfologia das linhagens desse estudo ainda será analisada.

7. CONCLUSÃO

Diferenças significativas no tamanho da célula, tamanho da cápsula e melanização foram observados entre as linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans* dependendo das condições de cultivo (meio, temperatura, *in vitro* e *in vivo*), o que pode em parte refletir na capacidade desse microrganismo em sobreviver frente a pressões ambientais e do hospedeiro.

8 REFERÊNCIAS

AKINS, R. A. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. **Med Mycol**, v. 43, n. 4, p. 285-318, Jun 2005. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16110776> >.

ALMEIDA, F.; WOLF, J. M.; CASADEVALL, A. Virulence-Associated Enzymes of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 14, n. 12, p. 1173-85, Dec 2015. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26453651> >.

ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Cell-to-cell spread and massive vacuole formation after *Cryptococcus neoformans* infection of murine macrophages. **BMC Immunol**, v. 8, p. 16, Aug 2007. ISSN 1471-2172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17705844> >.

ANTINORI, S. et al. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. **Eur J Intern Med**, v. 34, p. 21-28, Oct 2016. ISSN 1879-0828. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27394927> >.

ARAUJO, G. E. S. et al. Capsules from pathogenic and non-pathogenic *Cryptococcus* spp. manifest significant differences in structure and ability to protect against phagocytic cells. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e29561, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22253734> >.

BAHN, Y. S. et al. Sensing the environment: lessons from fungi. **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 1, p. 57-69, Jan 2007. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17170747> >.

BALLOU, E. R.; JOHNSTON, S. A. The cause and effect of *Cryptococcus* interactions with the host. **Curr Opin Microbiol**, v. 40, p. 88-94, Dec 2017. ISSN 1879-0364. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29154043> >.

BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 14: medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. **Yeast**, v. 27, n. 11, p. 875-904, Nov 2010. ISSN 1097-0061. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20641025> >.

BARRETT-BEE, K. et al. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. **J Gen Microbiol**, v. 131, n. 5, p. 1217-21, May 1985. ISSN 0022-1287. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3894572> >.

BAVA, A. J.; NEGRONI, R.; BIANCHI, M. Cryptococcosis produced by a urease negative strain of *Cryptococcus neoformans*. **J Med Vet Mycol**, v. 31, n. 1, p. 87-9, 1993. ISSN 0268-1218. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8483060> >.

BENNETT, J. E. et al. A comparison of amphotericin B alone and combined with flucytosine in the treatment of cryptococcal meningitis. **N Engl J Med**, v. 301, n. 3, p. 126-31, Jul 1979. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/449951> >.

BILLMYRE, R. B. et al. Highly recombinant VGII *Cryptococcus gattii* population develops clonal outbreak clusters through both sexual macroevolution and asexual microevolution. **MBio**, v. 5, n. 4, p. e01494-14, Jul 2014. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25073643> >.

BOVERS, M.; HAGEN, F.; BOEKHOUT, T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. **Rev Iberoam Micol**, v. 25, n. 1, p. S4-12, Mar 2008. ISSN 1130-1406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18338917> >.

BROWN, G. D. et al. Hidden killers: human fungal infections. **Sci Transl Med**, v. 4, n. 165, p. 165rv13, Dec 2012. ISSN 1946-6242. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23253612> >.

BRUESKE, C. H. Proteolytic activity of a clinical isolate of *Cryptococcus neoformans*. **J Clin Microbiol**, v. 23, n. 3, p. 631-3, Mar 1986. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3514663> >.

BYRNES, E. J. et al. *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. **Microbes Infect**, v. 13, n. 11, p. 895-907, Oct 2011. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21684347> >.

_____. Molecular evidence that the range of the Vancouver Island outbreak of *Cryptococcus gattii* infection has expanded into the Pacific Northwest in the United States. **J Infect Dis**, v. 199, n. 7, p. 1081-6, Apr 2009. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19220140> >.

BYRNES, E. J.; HEITMAN, J. *Cryptococcus gattii* outbreak expands into the Northwestern United States with fatal consequences. **F1000 Biol Rep**, v. 1, Aug 2009. ISSN 1757-594X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20150950> >.

BYRNES, E. J. et al. First reported case of *Cryptococcus gattii* in the Southeastern USA: implications for travel-associated acquisition of an emerging pathogen. **PLoS One**, v. 4, n. 6, p. e5851, Jun 2009. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19516904> >.

CANNON, R. D. et al. Efflux-mediated antifungal drug resistance. **Clin Microbiol Rev**, v. 22, n. 2, p. 291-321, Table of Contents, Apr 2009. ISSN 1098-6618. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19366916> >.

CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Curr Opin Microbiol**, v. 3, n. 4, p. 354-8, Aug 2000. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10972493> >.

CASADEVALL, A.; STEENBERGEN, J. N.; NOSANCHUK, J. D. 'Ready made' virulence and 'dual use' virulence factors in pathogenic environmental fungi--the *Cryptococcus neoformans* paradigm. **Curr Opin Microbiol**, v. 6, n. 4, p. 332-7, Aug 2003. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12941400> >.

CASALINUOVO, I. A.; DI FRANCESCO, P.; GARACI, E. Fluconazole resistance in *Candida albicans*: a review of mechanisms. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 8, n. 2, p. 69-77, 2004 Mar-Apr 2004. ISSN 1128-3602. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15267120> >.

CAZIN, J. et al. Extracellular deoxyribonuclease production by yeasts. **J Bacteriol**, v. 100, n. 2, p. 760-2, Nov 1969. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5354946> >.

CHANG, Y. C. et al. Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. **Infect Immun**, v. 72, n. 9, p. 4985-95, Sep 2004. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15321990> >.

CHARLIER, C. et al. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 77, n. 1, p. 120-7, Jan 2009. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18936186> >.

CHAYAKULKEEREE, M. et al. Role and mechanism of phosphatidylinositol-specific phospholipase C in survival and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 69, n. 4, p. 809-26, Aug 2008. ISSN 1365-2958. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18532984> >.

CHEN, S. C.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. *Cryptococcus gattii* infections. **Clin Microbiol Rev**, v. 27, n. 4, p. 980-1024, Oct 2014. ISSN 1098-6618. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25278580> >.

CHEN, S. C. et al. Purification and characterization of secretory phospholipase B, lysophospholipase and lysophospholipase/transacylase from a virulent strain of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Biochem J**, v. 347, n. Pt 2, p. 431-9, Apr 2000. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10749672> >.

_____. Identification of extracellular phospholipase B, lysophospholipase, and acyltransferase produced by *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 65, n. 2, p. 405-11, Feb 1997. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9009289> >.

CHEN, Y. L. et al. Convergent Evolution of Calcineurin Pathway Roles in Thermotolerance and Virulence in *Candida glabrata*. **G3 (Bethesda)**, v. 2, n. 6, p. 675-91, Jun 2012. ISSN 2160-1836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22690377> >.

CHOWDHARY, A. et al. Environmental prevalence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in India: an update. **Crit Rev Microbiol**, v. 38, n. 1, p. 1-16, Feb 2012. ISSN 1549-7828. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22133016> >.

CHRÉTIEN, F. et al. Pathogenesis of cerebral *Cryptococcus neoformans* infection after fungemia. **J Infect Dis**, v. 186, n. 4, p. 522-30, Aug 2002. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12195380> >.

COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. The intracellular life of *Cryptococcus neoformans*. **Annu Rev Pathol**, v. 9, p. 219-38, 2014. ISSN 1553-4014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24050625> >.

COELHO, C.; CASADEVALL, A. Cryptococcal therapies and drug targets: the old, the new and the promising. **Cell Microbiol**, v. 18, n. 6, p. 792-9, 06 2016. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26990050> >.

COGLIATI, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. **Scientifica (Cairo)**, v. 2013, p. 675213, 2013. ISSN 2090-908X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24278784> >.

COX, G. M. et al. Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. **Infect Immun**, v. 71, n. 1, p. 173-80, Jan 2003. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12496163> >.

DA SILVA, B. K. et al. Characterization of clinical isolates of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex from the Amazonas State in Brazil. **Rev Iberoam Micol**, v. 29, n. 1, p. 40-3, 2012 Jan-Mar 2012. ISSN 2173-9188. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21699993> >.

DATTA, K.; BARTLETT, K. H.; MARR, K. A. *Cryptococcus gattii*: Emergence in Western North America: Exploitation of a Novel Ecological Niche. **Interdiscip Perspect Infect Dis**, v. 2009, p. 176532, 2009. ISSN 1687-708X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19266091> >.

DOLAN, K. et al. Antifungal activity of tamoxifen: in vitro and in vivo activities and mechanistic characterization. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 8, p. 3337-46, Aug 2009. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19487443> >.

ENGELTHALER, D. M. et al. *Cryptococcus gattii* in North American Pacific Northwest: whole-population genome analysis provides insights into species evolution and dispersal. **MBio**, v. 5, n. 4, p. e01464-14, Jul 2014. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25028429> >.

FELL, J. W. et al. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 50 Pt 3, p.

1351-71, May 2000. ISSN 1466-5026. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10843082> >.

FERNANDES, K. E. et al. Species in the *Cryptococcus gattii* Complex Differ in Capsule and Cell Size following Growth under Capsule-Inducing Conditions. **mSphere**, v. 1, n. 6, 2016 Nov-Dec 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28066814> >.

FERREIRA, G. F. et al. 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, Aug 2013. ISSN 1460-2091. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23612570> >.

_____. Heteroresistance to Itraconazole Alters the Morphology and Increases the Virulence of *Cryptococcus gattii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 8, p. 4600-9, Aug 2015. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26014951> >.

FINDLEY, K. et al. Phylogeny and phenotypic characterization of pathogenic *Cryptococcus* species and closely related saprobic taxa in the Tremellales. **Eukaryot Cell**, v. 8, n. 3, p. 353-61, Mar 2009. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19151324> >.

FONSECA, F. L. et al. Immunomodulatory effects of serotype B glucuronoxylomannan from *Cryptococcus gattii* correlate with polysaccharide diameter. **Infect Immun**, v. 78, n. 9, p. 3861-70, Sep 2010. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20547742> >.

FRANCO-PAREDES, C. et al. Management of *Cryptococcus gattii* meningoencephalitis. **Lancet Infect Dis**, v. 15, n. 3, p. 348-55, Mar 2015. ISSN 1474-4457. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25467646> >.

FRASER, J. A. et al. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. **Nature**, v. 437, n. 7063, p. 1360-4, Oct 2005. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16222245> >.

FRASES, S. et al. *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide and exopolysaccharide fractions manifest physical, chemical, and antigenic differences. **Eukaryot Cell**, v. 7, n. 2, p. 319-27, Feb 2008. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18156290> >.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annu Rev Biochem**, v. 64, p. 97-112, 1995. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7574505> >.

FROMTLING, R. A. et al. Immunization of mice with an avirulent pseudohyphal form of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, v. 68, n. 3, p. 179-81, Sep 1979. ISSN 0301-486X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/394001> >.

GALANIS, E. et al. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999-2007. **Emerg Infect Dis**, v. 16, n. 2, p. 251-7, Feb 2010. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20113555> >.

GARCÍA-RODAS, R. et al. Role of Cln1 during melanization of *Cryptococcus neoformans*. **Front Microbiol**, v. 6, p. 798, 2015. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26322026> >.

GAZZONI, A. F. et al. Unusual morphologies of *Cryptococcus* spp. in tissue specimens: report of 10 cases. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 52, n. 3, p. 145-9, 2010 May-Jun 2010. ISSN 1678-9946. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20602024> >.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clin Microbiol Rev**, v. 12, n. 4, p. 501-17, Oct 1999. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10515900> >.

GIBSON, J. F.; JOHNSTON, S. A. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. **Fungal Genet Biol**, v. 78, p. 76-86, May 2015. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25498576> >.

HAGEN, F. et al. Ancient dispersal of the human fungal pathogen *Cryptococcus gattii* from the Amazon rainforest. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71148, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23940707> >.

_____. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genet Biol**, v. 78, p. 16-48, May 2015. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25721988> >.

HAMILTON, A. J.; HOLDOM, M. D. Biochemical comparison of the Cu,Zn superoxide dismutases of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Infect Immun**, v. 65, n. 2, p. 488-94, Feb 1997. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9009302> >.

HARRIS, J. R. et al. *Cryptococcus gattii* in the United States: clinical aspects of infection with an emerging pathogen. **Clin Infect Dis**, v. 53, n. 12, p. 1188-95, Dec 2011. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22016503> >.

_____. *Cryptococcus gattii* infections in multiple states outside the US Pacific Northwest. **Emerg Infect Dis**, v. 19, n. 10, p. 1620-6, Oct 2013. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24050410> >.

HENRY, J. et al. Characterization of inositol phospho-sphingolipid-phospholipase C 1 (Isc1) in *Cryptococcus neoformans* reveals unique biochemical features. **FEBS Lett**, v. 585, n. 4, p. 635-

40, Feb 2011. ISSN 1873-3468. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21256847> >.

HOANG, L. M. et al. Cryptococcus neoformans infections at Vancouver Hospital and Health Sciences Centre (1997-2002): epidemiology, microbiology and histopathology. **J Med Microbiol**, v. 53, n. Pt 9, p. 935-40, Sep 2004. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15314203> >.

JACOBSON, E. S.; JENKINS, N. D.; TODD, J. M. Relationship between superoxide dismutase and melanin in a pathogenic fungus. **Infect Immun**, v. 62, n. 9, p. 4085-6, Sep 1994. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8063430> >.

JONG, A. et al. Involvement of human CD44 during Cryptococcus neoformans infection of brain microvascular endothelial cells. **Cell Microbiol**, v. 10, n. 6, p. 1313-26, Jun 2008. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18248627> >.

KIDD, S. E. et al. A rare genotype of Cryptococcus gattii caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 49, p. 17258-63, Dec 2004. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15572442> >.

KLEIN, B. S.; TEBBETS, B. Dimorphism and virulence in fungi. **Curr Opin Microbiol**, v. 10, n. 4, p. 314-9, Aug 2007. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17719267> >.

KROCKENBERGER, M. B. et al. Pathogenesis of pulmonary Cryptococcus gattii infection: a rat model. **Mycopathologia**, v. 170, n. 5, p. 315-30, Nov 2010. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20552280> >.

KRONSTAD, J. W. et al. Expanding fungal pathogenesis: Cryptococcus breaks out of the opportunistic box. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 3, p. 193-203, Mar 2011. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21326274> >.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Epidemiologic differences between the two varieties of Cryptococcus neoformans. **Am J Epidemiol**, v. 120, n. 1, p. 123-30, Jul 1984a. ISSN 0002-9262. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6377880> >.

_____. High prevalence of Cryptococcus neoformans var. gattii in tropical and subtropical regions. **Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A**, v. 257, n. 2, p. 213-8, Jul 1984b. ISSN 0176-6724. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6207684> >.

KWON-CHUNG, K. J. et al. Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 4, n. 7, p. a019760, Jul 2014. ISSN 2157-1422. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24985132> >.

_____. Virulence, serotype, and molecular characteristics of environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Infect Immun**, v. 60, n. 5, p. 1869-74, May 1992. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1563776> >.

LALLOO, D. et al. Cryptococcal meningitis (*C. neoformans* var. *gattii*) leading to blindness in previously healthy Melanesian adults in Papua New Guinea. **Q J Med**, v. 87, n. 6, p. 343-9, Jun 1994. ISSN 0033-5622. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8041866> >.

LEBORGNE, N. **Carbohydrate content of *Eucalyptus gunnii* leaves along an annual cycle in the field and during induced frost-hardening in controlled conditions.** TEULIKRES, C. 1995.

LEITE, D. P. et al. *Cryptococcus* spp isolated from dust microhabitat in Brazilian libraries. **J Occup Med Toxicol**, v. 7, n. 1, p. 11, Jun 2012. ISSN 1745-6673. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22682392> >.

LEV, S. et al. Phospholipase C of *Cryptococcus neoformans* regulates homeostasis and virulence by providing inositol trisphosphate as a substrate for Arg1 kinase. **Infect Immun**, v. 81, n. 4, p. 1245-55, Apr 2013. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23381992> >.

LI, S. S.; MODY, C. H. *Cryptococcus*. **Proc Am Thorac Soc**, v. 7, n. 3, p. 186-96, May 2010. ISSN 1943-5665. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20463247> >.

LIN, J.; IDNURM, A.; LIN, X. Morphology and its underlying genetic regulation impact the interaction between *Cryptococcus neoformans* and its hosts. **Med Mycol**, v. 53, n. 5, p. 493-504, Jun 2015. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25841056> >.

LITVINTSEVA, A. P. et al. Evidence that the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* may have evolved in Africa. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e19688, May 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21589919> >.

_____. Many globally isolated AD hybrid strains of *Cryptococcus neoformans* originated in Africa. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 8, p. e114, Aug 2007. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17708680> >.

LITVINTSEVA, A. P.; MITCHELL, T. G. Population genetic analyses reveal the African origin and strain variation of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 2, p. e1002495, Feb 2012. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22383873> >.

LIU, T. B. et al. Brain inositol is a novel stimulator for promoting *Cryptococcus* penetration of the blood-brain barrier. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 4, p. e1003247, 2013. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23592982> >.

LONG, M. et al. Lipid raft/caveolae signaling is required for *Cryptococcus neoformans* invasion into human brain microvascular endothelial cells. **J Biomed Sci**, v. 19, p. 19, Feb 2012. ISSN 1423-0127. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22316086> >.

LUPETTI, A. et al. Molecular basis of resistance to azole antifungals. **Trends Mol Med**, v. 8, n. 2, p. 76-81, Feb 2002. ISSN 1471-4914. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11815273> >.

MA, H.; MAY, R. C. Virulence in *Cryptococcus* species. **Adv Appl Microbiol**, v. 67, p. 131-90, 2009. ISSN 0065-2164. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19245939> >.

MACDOUGALL, L. et al. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific Northwest, USA. **Emerg Infect Dis**, v. 13, n. 1, p. 42-50, Jan 2007. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17370514> >.

MADIGAN, M., PARKER. **Brock Biology of Microorganisms 10th edition** Pearson Education: 2004.

MARTINEZ, L. R. et al. Voriconazole inhibits melanization in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 12, p. 4396-400, Dec 2007. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17923488> >.

MATSUDA, Y. et al. Successful management of cryptococcosis of the bilateral adrenal glands and liver by unilateral adrenalectomy with antifungal agents: a case report. **BMC Infect Dis**, v. 11, p. 340, Dec 2011. ISSN 1471-2334. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22166121> >.

MAY, R. C. et al. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nat Rev Microbiol**, v. 14, n. 2, p. 106-17, 02 2016. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26685750> >.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 30, n. 1, p. 179-206, Mar 2016. ISSN 1557-9824. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26897067> >.

MCCALL, L. I.; SIQUEIRA-NETO, J. L.; MCKERROW, J. H. Location, Location, Location: Five Facts about Tissue Tropism and Pathogenesis. **PLoS Pathog**, v. 12, n. 5, p. e1005519, 05 2016. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27227827> >.

MEDNICK, A. J.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* affects lung inflammatory responses during cryptococcal infection. **Infect Immun**, v. 73, n. 4, p. 2012-9, Apr 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15784542> >.

MOODLEY, A. et al. Early clinical and subclinical visual evoked potential and Humphrey's visual field defects in cryptococcal meningitis. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52895, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23285220> >.

MOR, V. et al. Identification of a New Class of Antifungals Targeting the Synthesis of Fungal Sphingolipids. **MBio**, v. 6, n. 3, p. e00647, Jun 2015. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26106079> >.

MORRIS, A. M. Review: voriconazole for prevention or treatment of invasive fungal infections in cancer with neutropenia. **Ann Intern Med**, v. 161, n. 2, p. JC8, Jul 2014. ISSN 1539-3704. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25023274> >.

MORTENSON, J. A. et al. Detection of *Cryptococcus gattii* in selected urban parks of the Willamette Valley, Oregon. **Mycopathologia**, v. 175, n. 3-4, p. 351-5, Apr 2013. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23354596> >.

NARA, S. et al. Liver cryptococcosis manifesting as obstructive jaundice in a young immunocompetent man: report of a case. **Surg Today**, v. 38, n. 3, p. 271-4, 2008. ISSN 0941-1291. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18307005> >.

NETT, J. E.; ANDES, D. R. Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. **Infect Dis Clin North Am**, v. 30, n. 1, p. 51-83, Mar 2016. ISSN 1557-9824. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26739608> >.

NGAMSKULRUNGROJ, P. et al. The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. **MBio**, v. 3, n. 3, 2012. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22570277> >.

_____. Genetic diversity of the *Cryptococcus* species complex suggests that *Cryptococcus gattii* deserves to have varieties. **PLoS One**, v. 4, n. 6, p. e5862, Jun 2009. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19517012> >.

NICOLA, A. M. et al. Nonlytic exocytosis of *Cryptococcus neoformans* from macrophages occurs in vivo and is influenced by phagosomal pH. **MBio**, v. 2, n. 4, 2011. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21828219> >.

NIELSEN, K.; DE OBALDIA, A. L.; HEITMAN, J. *Cryptococcus neoformans* mates on pigeon guano: implications for the realized ecological niche and globalization. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 6, p. 949-59, Jun 2007. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17449657> >.

NOONEY, L.; MATTHEWS, R. C.; BURNIE, J. P. Evaluation of Mycograb, amphotericin B, caspofungin, and fluconazole in combination against *Cryptococcus neoformans* by checkerboard and time-kill methodologies. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 51, n. 1, p. 19-29, Jan 2005. ISSN 0732-8893. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15629225> >.

NOSANCHUK, J. D.; OVALLE, R.; CASADEVALL, A. Glyphosate inhibits melanization of *Cryptococcus neoformans* and prolongs survival of mice after systemic infection. **J Infect Dis**, v. 183, n. 7, p. 1093-9, Apr 2001. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11237835> >.

ODOM, A. et al. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **EMBO J**, v. 16, n. 10, p. 2576-89, May 1997. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9184205> >.

OLSZEWSKI, M. A.; ZHANG, Y.; HUFFNAGLE, G. B. Mechanisms of cryptococcal virulence and persistence. **Future Microbiol**, v. 5, n. 8, p. 1269-88, Aug 2010. ISSN 1746-0921. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20722603> >.

PAPPAS, P. G. Cryptococcal infections in non-HIV-infected patients. **Trans Am Clin Climatol Assoc**, v. 124, p. 61-79, 2013. ISSN 0065-7778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23874010> >.

PARK, B. J. et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v. 23, n. 4, p. 525-30, Feb 2009. ISSN 1473-5571. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19182676> >.

PEDROSO, R. S. et al. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* - Pathogenicity of environmental isolates correlated to virulence factors, susceptibility to fluconazole and molecular profile. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 8, p. 993-1000, Dec 2010. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21225196> >.

PERFECT, J. R. The antifungal pipeline: a reality check. **Nat Rev Drug Discov**, May 2017. ISSN 1474-1784. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28496146> >.

PERFECT, J. R.; BICANIC, T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. **Fungal Genet Biol**, v. 78, p. 49-54, May 2015. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25312862> >.

PERFECT, J. R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. **Clin Infect Dis**, v. 50, n. 3, p. 291-322, Feb 2010. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20047480> >.

PFALLER, M. A. et al. Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. **J Clin Microbiol**, v. 26, n. 8, p. 1437-41, Aug 1988. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3049651> >.

PHADKE, S. S.; FERETZAKI, M.; HEITMAN, J. Unisexual reproduction enhances fungal competitiveness by promoting habitat exploration via hyphal growth and sporulation.

Eukaryot Cell, v. 12, n. 8, p. 1155-9, Aug 2013. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23794511> >.

PHILLIPS, P. et al. Longitudinal clinical findings and outcome among patients with *Cryptococcus gattii* infection in British Columbia. **Clin Infect Dis**, v. 60, n. 9, p. 1368-76, May 2015. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25632012> >.

PINTI, M. et al. Identification and characterization of an aspartyl protease from *Cryptococcus neoformans*. **FEBS Lett**, v. 581, n. 20, p. 3882-6, Aug 2007. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17651737> >.

POLACHEK, I.; PLATT, Y.; ARONOVITCH, J. Catecholamines and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 58, n. 9, p. 2919-22, Sep 1990. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2117574> >.

PRATES, R. A. et al. Effect of virulence factors on the photodynamic inactivation of *Cryptococcus neoformans*. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54387, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23349872> >.

RAJASINGHAM, R. et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **Lancet Infect Dis**, v. 17, n. 8, p. 873-881, 08 2017. ISSN 1474-4457. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28483415> >.

RIBEIRO, N. Q. et al. Atorvastatin as a promising anticryptococcal agent. **Int J Antimicrob Agents**, v. 49, n. 6, p. 695-702, Jun 2017. ISSN 1872-7913. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28450174> >.

RIVERA, J. et al. Organ-dependent variation of capsule thickness in *Cryptococcus neoformans* during experimental murine infection. **Infect Immun**, v. 66, n. 10, p. 5027-30, Oct 1998. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9746613> >.

ROCHA, J. D. et al. Capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* modulate production of neutrophil extracellular traps (NETs) by human neutrophils. **Sci Rep**, v. 5, p. 8008, Jan 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25620354> >.

RODRIGUES, M. L. Funding and Innovation in Diseases of Neglected Populations: The Paradox of Cryptococcal Meningitis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 3, p. e0004429, Mar 2016. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26964103> >.

ROGERS, D. C. et al. Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. **Mamm Genome**, v. 8, n. 10, p. 711-3, Oct 1997. ISSN 0938-8990. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9321461> >.

ROGERS, P. D.; BARKER, K. S. Genome-wide expression profile analysis reveals coordinately regulated genes associated with stepwise acquisition of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 4, p. 1220-7, Apr 2003. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12654650> >.

SABIITI, W.; MAY, R. C. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Future Microbiol**, v. 7, n. 11, p. 1297-313, Nov 2012. ISSN 1746-0921. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23075448> >.

SAIJO, T. et al. Anti-granulocyte-macrophage colony-stimulating factor autoantibodies are a risk factor for central nervous system infection by *Cryptococcus gattii* in otherwise immunocompetent patients. **MBio**, v. 5, n. 2, p. e00912-14, Mar 2014. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24643864> >.

SANTOS, J. R. et al. Fluconazole alters the polysaccharide capsule of *Cryptococcus gattii* and leads to distinct behaviors in murine *Cryptococcosis*. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e112669, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25392951> >.

SANTOS, J. R. A. et al. High-dose fluconazole in combination with amphotericin B is more efficient than monotherapy in murine model of *cryptococcosis*. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 4661, Jul 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28680034> >.

SHI, M. et al. Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. **J Clin Invest**, v. 120, n. 5, p. 1683-93, May 2010. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20424328> >.

SIAFAKAS, A. R. et al. Lipid rafts in *Cryptococcus neoformans* concentrate the virulence determinants phospholipase B1 and Cu/Zn superoxide dismutase. **Eukaryot Cell**, v. 5, n. 3, p. 488-98, Mar 2006. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16524904> >.

SMITH, D. G. et al. Isolation and characterization from pathogenic fungi of genes encoding ammonium permeases and their roles in dimorphism. **Mol Microbiol**, v. 50, n. 1, p. 259-75, Oct 2003. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14507379> >.

SPRINGER, D. J. et al. *Cryptococcus gattii* VGIII isolates causing infections in HIV/AIDS patients in Southern California: identification of the local environmental source as arboreal. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 8, p. e1004285, Aug 2014. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25144534> >.

STEENBERGEN, J. N.; CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Microbes Infect**, v. 5, n. 7, p. 667-75, Jun 2003. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787743> >.

STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in

macrophages. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 26, p. 15245-50, Dec 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11742090> >.

SUBRAMANIAN, S.; MATHAI, D. Clinical manifestations and management of cryptococcal infection. **J Postgrad Med**, v. 51 Suppl 1, p. S21-6, 2005. ISSN 0022-3859. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16519251> >.

SÁNCHEZ, M.; COLOM, F. Extracellular DNase activity of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Rev Iberoam Micol**, v. 27, n. 1, p. 10-3, Mar 2010. ISSN 1130-1406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20167522> >.

TUITE, N. L.; LACEY, K. Overview of invasive fungal infections. **Methods Mol Biol**, v. 968, p. 1-23, 2013. ISSN 1940-6029. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23296882> >.

URAI, M. et al. Evasion of Innate Immune Responses by the Highly Virulent *Cryptococcus gattii* by Altering Capsule Glucuronoxylomannan Structure. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 5, p. 101, 2015. ISSN 2235-2988. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26779451> >.

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 11, p. 3394-400, Nov 2002. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12384341> >.

VOELZ, K.; MAY, R. C. Cryptococcal interactions with the host immune system. **Eukaryot Cell**, v. 9, n. 6, p. 835-46, Jun 2010. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20382758> >.

VU, K. et al. Invasion of the central nervous system by *Cryptococcus neoformans* requires a secreted fungal metalloprotease. **MBio**, v. 5, n. 3, p. e01101-14, Jun 2014. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24895304> >.

WANG, F. et al. Short-time effect of heavy metals upon microbial community activity. **J Hazard Mater**, v. 173, n. 1-3, p. 510-6, Jan 2010. ISSN 1873-3336. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19748181> >.

WANG, L.; LIN, X. The morphotype heterogeneity in *Cryptococcus neoformans*. **Curr Opin Microbiol**, v. 26, p. 60-4, Aug 2015. ISSN 1879-0364. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26094087> >.

WILLIAMS, V.; DEL POETA, M. Role of glucose in the expression of *Cryptococcus neoformans* antiphagocytic protein 1, App1. **Eukaryot Cell**, v. 10, n. 3, p. 293-301, Mar 2011. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21239626> >.

WILLIAMSON, J. D. et al. Atypical cytomorphologic appearance of *Cryptococcus neoformans*: a report of five cases. **Acta Cytol**, v. 40, n. 2, p. 363-70, 1996 Mar-Apr 1996. ISSN 0001-5547. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8629428> >.

WILLIAMSON, P. R. Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. **Front Biosci**, v. 2, p. e99-107, Nov 1997. ISSN 1093-9946. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9342305> >.

WILLIAMSON, P. R. et al. Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. **Nat Rev Neurol**, v. 13, n. 1, p. 13-24, Jan 2017. ISSN 1759-4766. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27886201> >.

WRIGHT, L. C. et al. Cryptococcal lipid metabolism: phospholipase B1 is implicated in transcellular metabolism of macrophage-derived lipids. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 1, p. 37-47, Jan 2007. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17099081> >.

XU, J.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T. G. Multiple gene genealogies reveal recent dispersion and hybridization in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Mol Ecol**, v. 9, n. 10, p. 1471-81, Oct 2000. ISSN 0962-1083. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11050543> >.

ZARAGOZA, O. et al. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. **Cell Microbiol**, v. 10, n. 10, p. 2043-57, Oct 2008. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18554313> >.

ZAVREL, M.; WHITE, T. C. Medically important fungi respond to azole drugs: an update. **Future Microbiol**, v. 10, n. 8, p. 1355-73, 2015. ISSN 1746-0921. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26234644> >.

ZHAI, B. et al. The antidepressant sertraline provides a promising therapeutic option for neurotropic cryptococcal infections. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 7, p. 3758-66, Jul 2012. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22508310> >.

9. ANEXO:

Documento aprovação do Comitê de ética no uso de animais



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: [235/2017](#)

Título do projeto: Influência da diversidade filogenética de *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans* na progressão da criptococose em modelo murino.

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Daniel de Assis Santos

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Microbiologia

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 02/10/2017. Validade: 02/10/2017 à 01/10/2022

Belo Horizonte, 02/10/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/