

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BACHARELADO

LUÉLIDA RIBEIRO SANTOS

**Atributos de Virulência por Isolados de *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*
de Origem Clínica e Ambiental em Maceió, Alagoas.**

MACEIÓ
2020

LUÉLIDA RIBEIRO SANTOS

**Atributos de Virulência por Isolados de *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*
de Origem Clínica e Ambiental em Maceió, Alagoas.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
corpo docente do Instituto de Ciências Biológicas
e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas,
como requisito parcial para obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Maria Wanderlei
Silva

MACEIÓ

2020

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade – CRB-4 - 1251

S237a Santos, Luélida Ribeiro.

Atributos de virulência por isolados de *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* de origem clínica e ambiental em Maceió, Alagoas / Luélida Ribeiro Santos. – 2020.

46 f.

Orientadora: Denise Maria Wanderlei Silva.

Monografia (Trabalho de conclusão de curso em bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2020.

Bibliografia: f. 40-45.

Apêndice: f. 46

1. Virulência. 2. Criptococose. 3. *Cryptococcus gattii*. 4. *Cryptococcus neoformans*. I. Título.

CDU: 578.72

FOLHA DE APROVAÇÃO

LUÉLIDA RIBEIRO SANTOS

**Atributos de Virulência por Isolados de *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*
de Origem Clínica e Ambiental em Maceió, Alagoas.**

Trabalho de conclusão de curso submetido ao
corpo docente do Instituto de Ciências Biológicas
e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e
aprovado em ____ de ____ de 2020.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Maria Wanderlei Silva
Universidade Federal de Alagoas

Banca examinadora:

Profa. Dra. Leonora Tavares Bastos
Universidade Federal de Alagoas

Profa. Msc. Fernanda Maria Araújo de Souza
Universidade Federal de Alagoas

AGRADECIMENTOS

- *A Deus por estar sempre presente na vida e por ter me dado forças para chegar até aqui.*
- *Aos meus pais e minha irmã Luana pelo amor incondicional, princípios ensinados e total apoio e incentivo durante toda a minha vida.*
- *À minha família por sempre torcer pelo meu sucesso.*
- *À minha orientadora Profa. Dra. Denise Maria Wanderlei Silva pela oportunidade, por todo conhecimento transmitido, pelo tempo dedicado e pelo incentivo de sempre buscar mais para meu desenvolvimento pessoal e profissional.*
- *À Profa. Dra. Fernanda Cristina de Albuquerque Maranhão por todo conhecimento transmitido e por disponibilizar o uso dos equipamentos do Laboratório de Microbiologia Clínica.*
- *À banca examinadora (Profa. Dra. Leonora Tavares Bastos e Profa. Msc. Fernanda Maria Araújo de Souza) pela disponibilidade em colaborar com o meu trabalho.*
- *Aos amigos do LabMicol e LMC, Aline, Douglas, Geone, Madson, Tamires, Arthur, Luisa, Marcílio, Isabelle e Camila pelos bons momentos, pela companhia e por toda ajuda quando precisei.*
- *Aos meus amigos, Emmily, Angélica, Aline, Lylyan, Priscila, Polyane, Jordana, Adriane e Talyta por tornarem meus dias mais divertidos e por todo apoio dado nos momentos difíceis.*

RESUMO

A criptococose, conhecida popularmente como “doença do pombo”, acomete normalmente indivíduos imunocomprometidos após leveduras encapsuladas do complexo (*Cryptococcus gattii*/*C. neoformans*) serem inaladas do ambiente, as quais a partir dos pulmões podem se disseminar via hematogênica e resultar em meningite criptocócica, que apresenta evolução grave e fatal, se não for diagnosticada precocemente. O presente trabalho investigou a atividade de exoenzimas, como fenoloxidase, fosfolipase e urease, além da presença de cápsula mucopolissacarídica e da termotolerância a 37°C por *C. gattii* (n= 6) e *C. neoformans* (n= 19) de origem clínica (Hospital Escola Hélio Auto - HEHA), ambiental (occos de árvores e excretas de pombos) e padrões moleculares (IPEC/FioCruz-RJ). Todos os isolados apresentaram atividade das exoenzimas (positiva: P e fortemente positiva: FP), entretanto, a fosfolipase apresentou intensidade discretamente elevada (FP) nos isolados de *C. neoformans* (n=17/19; 89,5%) em comparação com *C. gattii* (n=5/6; 83,3%). Como não foram incluídas na análise cepas clínicas de *C. gattii*, não foi possível comparar a ação da enzima em relação a *C. neoformans*, entretanto, nos isolados ambientais desta espécie (n= 6) todos foram FP, enquanto que nos padrões moleculares não houve diferença entre as atividades das duas espécies (75% FP e 25% P). Paralelamente, a capacidade de termotolerância foi alcançada por todos os isolados estudados. A aptidão para produzir cápsula foi também averiguada em todas as cepas, entretanto, por se tratar de amostras semeadas em meio de cultura, as mesmas apresentaram espessura delgada em relação às geralmente produzidas em líquido ou plasma. Dessa forma, a produção concomitante desses fatores de virulência revelou a presença de isolados de *C. gattii* e *C. neoformans* com alto potencial virulento circulando no estado de Alagoas, independentemente da sua fonte, se clínica ou ambiental. Os dados obtidos desse trabalho poderão colaborar para a determinação mais rigorosa do perfil de suscetibilidade a antifúngicos. Esse é provavelmente o primeiro relato de atividade exoenzimática da fosfolipase em Alagoas.

Palavras-chave: complexo *Cryptococcus*; criptococose; exoenzimas; virulência.

ABSTRACT

Cryptococcosis, popularly known as “pigeon disease”, usually affects immunocompromised patients, after encapsulated yeasts of the complex (*Cryptococcus gattii* / *C. neoformans*) are inhaled in the environment, which, from the lungs, can spread through the hematogenic way and then result in cryptococcal meningitis, which presents a serious and fatal evolution if it is not diagnosed early. This work aimed to investigate the exposure activities, such as phenoloxidase, phospholipase and urease, in addition to the presence of mucopolysaccharide capsules and thermotolerance at 37°C by *C. gattii* (No = 6) and *C. neoformans* (No= 19) from clinical origin (Hospital Escola Hlvio Auto - HEHA), environmental (trees and pigeon droppings) and molecular patterns (IPEC/FioCruz-RJ). All studies showed exoenzyme activity (positive: P and strongly positive: SP), however, a phospholipase showed a slightly high intensity (SP) in the levels of *C. neoformans* (No = 17/19; 89,5%) compared to *C. gattii* (No = 5/6; 83.3%). As clinical strains of *C. gattii* were not included in the analysis, it was not possible to compare the action of the enzyme in relation to *C. neoformans*, however, in reference to environmental strains, all isolates of this species (No= 6) were SP, whereas in molecular patterns there was no difference between the activities of the two species, 75% (SP) and 25% (P) for both. In parallel, the thermotolerance capacity was achieved by all studied isolates. The ability to produce capsules was also investigated in all strains, however, as they were samples cultured in culture medium, they were thin in relation to those generally produced in liquor or plasma. Thus, the concomitant production of these virulence factors revealed isolates of *C. gattii* and *C. neoformans* with high virulent potential circulating in the state of Alagoas, regardless of their source, whether clinical or environmental. The data obtained from this study may contribute to a more rigorous determination of the profile of susceptibility to antifungals. This is probably the first report of phospholipase exoenzymatic activity in Alagoas.

Key-words: *Cryptococcus* complex; cryptococcosis; Exoenzymes; virulence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo reprodutivo sexuado do gênero <i>Cryptococcus/Filobasidiella</i> induzido em laboratório.....	15
Figura 2 - Transmissão e patogênese de <i>Cryptococcus</i> a partir da inalação de propágulos infectados, seguidas da colonização dos alvéolos pulmonares, podendo evoluir à neurocriptococose.....	16
Figura 3 - Esquema dos principais fatores de virulência presentes em <i>Cryptococcus</i> e localização celular dos alvos potenciais para antifúngicos para a terapia anticriptocócica.....	19
Figura 4 - Cápsula característica de <i>Cryptococcus</i> sobre um fundo negro (exame direto com tinta da China) em uma amostra de líquido de paciente do HEHA com neurocriptococose. C= cápsula e B= blastoconídio.....	20
Figura 5 - Esquema da produção de fosfolipase representada pela formação de um halo branco ao redor da colônia devido à precipitação de sais de cálcio em uma placa de Petri contendo meio de ágar gema de ovo.....	27
Figura 6 - Fotografia de levedura cultivada em ágar semente de niger representando a produção de melanina após incubação a 30°C por 5 dias: a) colônias de uma cepa de <i>C. neoformans</i> (WM629); b) colônias escuras da mesma cepa de <i>Cryptococcus</i> produtoras de melanina e cremes de <i>Candida albicans</i> (ATCC 9002) não produtoras do pigmento; c) colônias de cepas de <i>C. gattii</i> WM 179 = 59, WM 178 = 60, WM 175 = 61 e WM 779 = 62.....	31
Figura 7 - Fotomicrografia de luz de blastoconídios e cápsula de espessura delgada de isolado clínico <i>Cryptococcus neoformans</i> (amostra LCR 167) em preparação de tinta da China.....	33
Figura 8 - Colônias (C) de <i>Cryptococcus gattii</i> (WM179 = 59) em meio ASD exibindo a tonalidade creme e textura mucoide após incubação por sete dias a 37°C.....	33
Figura 9 - Fotografias representativas da zona de precipitação de cristais de cálcio resultante da ação fosfolipásica em quatro cepas de <i>Cryptococcus</i> : a) <i>C. neoformans</i> de fonte ambiental #3-2 = 14, com código Pz 3 (FP); b) <i>C. gattii</i> dos padrões moleculares WM 175 = 61 e WM 779 = 62, com código Pz 2 (P) e Pz 3 (FP), respectivamente e <i>C. neoformans</i> 173 de fonte clínica, com código Pz 3 (FP).....	36
Figura 10 - Teste de produção da urease em isolado de <i>C. neoformans</i> (amostra167) em ágar ureaia de Christensen. (U+) Amostra positiva (LCR167); (C-) controle negativo sem inoculação do meio.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação da atividade enzimática da fosfolipase em <i>Cryptococcus</i> spp. de fontes clínicas e ambientais de Alagoas, o índice e o código referente à sua atividade.	27
Tabela 2 - Isolados utilizados no estudo discriminados por espécie e origem de isolamento, clínica, ambiental ou da micoteca (padrões moleculares) do IPC, FioCruz-RJ.....	29
Tabela 3 - Descrição dos resultados dos testes realizados para produção dos fatores de virulência dos isolados de <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i> estudados (n=25).....	30
Tabela 4 - Atividade enzimática das cepas clínicas, ambientais e de padrões moleculares de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> (n=25) conforme a classificação pelo índice Pz e o código.....	35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Isolados de *Cryptococcus* spp. obtidos de amostras clínicas e ambientais em Maceió-AL, com descrição da fonte de origem e dos genótipos e cepas padrão molecular utilizadas para comparação das características fenotípicas.....

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 <i>Cryptococcus</i>	14
2.2 Patogenia e Manifestações Clínicas.....	15
2.3 Diagnóstico Clínico.....	17
2.4 Tratamento.....	18
2.5 Fatores de Virulência.....	19
2.5.1 Fenoloxidase - Produção de melanina.....	20
2.5.2 Cápsula polissacarídica.....	20
2.5.3 Termotolerância.....	21
2.5.4 Fosfolipase.....	21
2.5.5 Urease.....	22
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo Geral.....	23
3.2 Objetivos Específicos.....	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Isolados Testados.....	24
4.2 Estocagem.....	25
4.3 Avaliação dos Fatores de Virulência.....	25
4.3.1 Pesquisa de fenoloxidase	25

4.3.2 Produção de cápsula polissacarídica.....	26
4.3.3 Termotolerância.....	26
4.3.4 Pesquisa de fosfolipase.....	26
4.3.5 Pesquisa de urease.....	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	29
5.1 Pesquisa de Fenoloxidase.....	31
5.2 Produção de Cápsula Polissacarídica.....	32
5.3 Termotolerância.....	33
5.4 Produção de Fosfolipase.....	34
5.5 Produção de Urease.....	37
6 CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS	40
APÊNDICE	46

1 INTRODUÇÃO

A criptococose, doença oportunista com caráter sistêmico, e conhecida popularmente como “doença do pombo”, acomete geralmente indivíduos imunocomprometidos, principalmente portadores do vírus HIV/AIDS, sendo os sintomas pulmonares, característicos do estágio primário da doença (p.ex.: tosse duradoura) e sistêmicos, típicos do estágio secundário (p.ex.: meningoencefalite). As duas espécies de leveduras que representam o complexo *Cryptococcus*: *C. neoformans* e *C. gattii*, podem ser isoladas a partir de amostras clínicas, sendo a primeira a mais frequente (MAZIARZ; PERFECT, 2016). A mortalidade pela doença pode variar de 10%-43% nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, respectivamente, com tempo médio estimado de sobrevida de 14 dias (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008).

Embora o gênero *Cryptococcus* agrupe espécies crípticas, isto é, são distintas biologicamente e morfologicamente idênticas (a presença de cápsula é um importante achado para o diagnóstico), há diferenças ecológicas importantes (SIDRIM; ROCHA, 2010). *Cryptococcus neoformans* apresenta as excretas de aves (p.ex.: pombos) como seu principal reservatório ambiental utilizando a ureia como nutriente (LEE et al., 2013), enquanto que *C. gattii* está associada a componentes ambientais, como árvores (p.ex.: *Eucalyptus globulus* e *Senna* sp.), detritos orgânicos e solo (KNOW-CHUNG; SAIJO, 2015).

A infecção ocorre normalmente através da inalação de propágulos fúngicos presentes no ambiente, embora a infecção por trauma ou ingestão possa ocorrer (CHRISTIANSON et al., 2003; MAZIARZ; PERFECT, 2016), podendo o tempo de incubação da doença variar a depender do estado imunológico do indivíduo (SCHMALZLE et al., 2016). Para garantir a instalação e o sucesso da infecção, *C. neoformans* e *C. gattii* expressam fatores de virulência como mecanismo para contornar o sistema imune (invasão e/ou a evasão do sistema imunológico do hospedeiro, que favorece à disseminação hematogênica e meníngea), como a produção de cápsula e da melanina, e obter nutrientes a partir do hospedeiro (p.ex.: produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas) (ALMEIDA et al., 2015), os quais variam na sua resposta, a depender da cepa (CHEN et al., 1997).

Em investigações anteriores do LabMicol (ICBS/UFAL), diversos isolados clínicos, provenientes de pacientes com neurocriptococose, e ambientais, das duas espécies do complexo, já foram bem caracterizados por provas sorológicas (teste imunocromatográfico rápido CrAg) e moleculares (genotipagem do URA-5 por PCR/RFLP), mas carecíamos de

uma caracterização mais detalhada de fatores de virulência, principalmente de exoenzimas, e que incluísse as cepas representadas pelos padrões moleculares.

Visto isso, e considerando os poucos dados referentes à produção desses atributos pelas duas espécies do complexo *Cryptococcus* no estado de Alagoas, o objetivo do presente estudo foi o de descrever a produção de fatores de virulência de isolados clínicos e ambientais *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Cryptococcus*

O gênero *Cryptococcus* pertence ao filo Basidiomycota e agrupa aproximadamente 80 espécies de leveduras ubíquas encontradas normalmente em matéria orgânica em decomposição (CHEN et al., 2014; SMITH et al., 2017). Dentre as espécies, duas são de interesse médico devido ao seu potencial patogênico, *C. neoformans* e *C. gattii*, sendo *C. neoformans* isolada com mais frequência a partir de amostras clínicas de pacientes imunodeprimidos e imunocompetentes, quando comparada a *C. gattii*, este último normalmente acometendo imunodeprimidos (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

As espécies de *Cryptococcus*, que constituem o complexo *C.gattii-C.neoformans*, são consideradas crípticas, pois são biologicamente distintas entre si e morfologicamente idênticas, e são envoltas por uma cápsula composta por polissacarídeo, esta sendo o seu diferencial morfológico para a identificação clássica (SIDRIM; ROCHA, 2010). Entretanto, estudos baseados em análises moleculares e sequenciamento genético sugeriram a subdivisão de *C. neoformans* em *C.neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D ou tipo molecular VNIV); *C.neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) e dois genótipos (VNI e VNII) e híbrido A/D, genótipo VNIII; além de *C. gattii* (sorotipos B e C) em *C. gattii*, *C.deuteroagattii*, *C. bacillisporus*, *C. tetragattii* e *C. decagattii* (genótipos VGI, VGII, VGIII VGIV e VGIV/VGIIIc, respectivamente) (MAY et al., 2016).

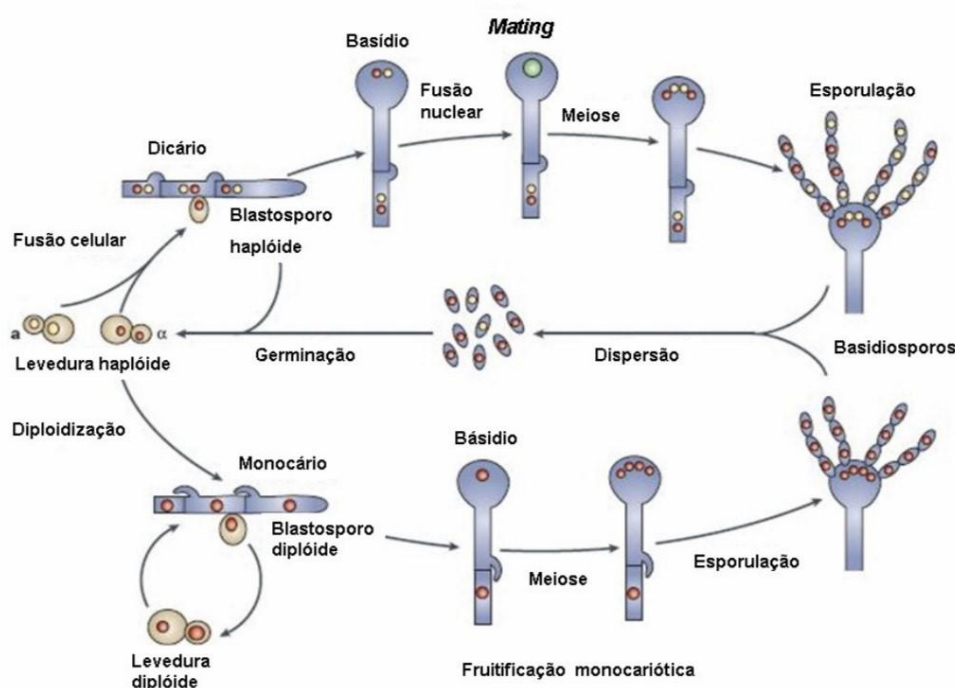
O gênero é cosmopolita, havendo um perfil mais específico de distribuição, a depender do sorotipo e/ou espécie. A espécie *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) é encontrada mundialmente, enquanto *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) é observada principalmente em países europeus. Enquanto que *C. gatti* apresenta uma distribuição geográfica mais restrita às regiões tropicais e subtropicais, como sul da Califórnia, Havaí, Brasil, Austrália, sudeste da Ásia, e África central, embora nos últimos anos tenham havido relatos da sua presença em regiões temperadas, tendo o aquecimento global como um possível aliado para o novo cenário de distribuição (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

Cryptococcus neoformans pode ser isolada a partir de excretas de aves (p.ex.: pombos), da qual o fungo utiliza a ureia como nutriente (LEE et al., 2013), enquanto que *C. gattii* está geralmente associada a componentes ambientais, como árvores, detritos orgânicos e solo (KNOW-CHUNG; SAIJO, 2015), entretanto, ambas as espécies já foram descritas como

associadas de forma comensal em amebas de vida-livre em nematódeos no solo (MAY et al., 2016).

As duas formas reprodutivas, sexuada e assexuada, estão presentes no gênero *Cryptococcus* (Figura 1). Quando designamos o gênero na sua forma parasitária ou livre no ambiente nos referimos à forma imperfeita (anamorfa/assexuada/haploide), que é caracterizada como células leveduriformes globosas, encapsuladas e que se reproduzem por brotamento (n/mitose), enquanto que o gênero *Filobasidiella* designa a forma perfeita (teleomorfa/sexuada/diploide), que é caracterizada como a forma filamentosa, produzindo fíbulas, basídias (2n) e basiosporos (n), entretanto, a forma perfeita somente é observada em condições laboratoriais controladas (MAZIARZ; PERFECT, 2016; SIDRIM; ROCHA, 2010).

Figura 1 - Ciclo reprodutivo sexuado do gênero *Cryptococcus/Filobasidiella* induzido em laboratório.



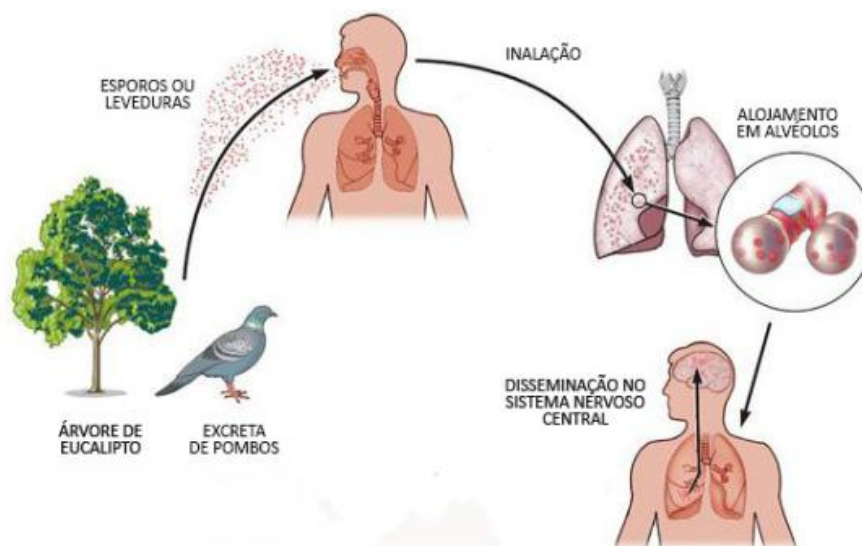
Fonte: Adaptado de Idnurm et al. (2005).

2.2 Patogenia e Manifestações Clínicas

A infecção por leveduras do gênero *Cryptococcus* pode ocorrer através da inalação de propágulos fúngicos presentes no ambiente, provenientes normalmente de excreta de aves (p. ex.: pombos) e ocos de árvores, conforme a Figura 2. A infecção seguida por trauma físico e

por ingestão são menos frequentes (CHRISTIANSON et al., 2003; MAZIARZ; PERFECT, 2016).

Figura 2 - Transmissão e patogênese de *Cryptococcus* a partir da inalação de propágulos infectados, seguidas da colonização dos alvéolos pulmonares, podendo evoluir à neurocriptococose.



Fonte: Ministério da Saúde.

Após alcançar os alvéolos pulmonares (micose primária), o fungo pode causar pneumonia em pacientes com supressão do sistema imune, principalmente pacientes HIV+, ou pode permanecer em latência (quadro clínico assintomático) em indivíduos imunocompetentes, entretanto, podem se multiplicar dentro de fagócitos e se disseminar por tecidos corpóreos, consolidando a doença ativa em pacientes imunodeprimidos (SCHMALZLE et al., 2016). Já a segunda fase da infecção (micose secundária), é caracterizada quando as leveduras ultrapassam o parênquima pulmonar, percorrem a corrente sanguínea e se instalam no Sistema Nervoso Central (SNC), causando a inflamação das meninges (meningite criptocócica) e aumento da pressão intracraniana (MAY et al., 2016), além de sintomas inespecíficos como febre, náusea, vômito e diplopia (visão dupla) (WILLIAMSON et al., 2017).

Segundo Coelho et al. (2014), o neurotropismo de *Cryptococcus* pelo SNC está associado a vários fatores de virulência específicos que facilitam a penetração da barreira hematoencefálica, como metaloproteinases e ureases, e mecanismos que facilitam a sobrevivência em meio carente de nutrientes no cérebro, como autofagia e aumento da afinidade pelos transportadores de açúcar. Além disso, outros sítios podem ser acometidos como pelo, olhos, ossos e próstata (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

Dados epidemiológicos sobre a doença em Alagoas (SINAN), de 2007-2011, confirmaram 11 casos de criptococose em adultos com AIDS, principalmente do sexo masculino (20-29 anos). A prevalência da meningite criptocócica no estado de Alagoas pode estar subestimada, uma vez que não é de notificação compulsória, e possivelmente incluída dentre os casos confirmados e notificados nas categorias MNE (meningite não especificada) ou MOE (meningite por outras etiologias), com 14 casos dos 80 confirmados em 2015, de acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação-Alagoas (tabnet.datassus.gov.br).

2.3 Diagnóstico Clínico

O diagnóstico para a criptococose pode ser obtido a partir da identificação fenotípica clássica, isto é, através da morfologia e testes bioquímicos; teste rápido para detecção do antígeno polissacarídico capsular criptocócico (CrAg) e/ou identificação molecular, sendo os dois primeiros métodos de identificação os mais viáveis economicamente para o Sistema Público de Saúde, embora apresentem limitações diagnósticas (RIVERA et al., 2015).

A identificação fenotípica clássica consiste na observação da presença da cápsula após coloração direta com tinta nanquim (tinha da China) de amostras clínicas, por exemplo, pus de abscesso, urina, aspirados de medula óssea e de gânglios, lavado brônquico, líquido cefalorraquidiano (LCR), ou de isolados provenientes de culturas (SIDRIM; ROCHA, 2010). Adicionalmente, testes bioquímicos para confirmação do gênero podem ser efetuados, como o teste de urease, fenoloxidade, ambas positivas para *Cryptococcus*, e semeio em L-cavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) para diferenciação das espécies *C. neoformans* (negativo; meio permanece âmbar) e *C. gattii* (positivo; o meio transiciona para o azul) (MCTAGGART et al., 2011).

Adicionalmente, as provas rápidas detectam o antígeno polissacarídico capsular criptocócico (CrAg) por meio da formação do complexo antígeno-anticorpo em látex (látex-CrAg) ou imunoensaio (EIE), estes sendo os mais clássicos, ou ainda através do ensaio de fluxo lateral para detecção do antígeno criptocócico (LFA-CrAg), uma técnica imunocromatográfica, a qual permite a detecção a partir de soro, plasma, sangue total e líquido (VIDAL; BOULWERE, 2015).

Várias sequências de DNA específicas podem ser empregadas para detecção de espécies do complexo *Cryptococcus*, como URA5, CAP59, M13 e ITS (18S, 5.8S e 28S), sendo a

região ITS do DNAr (DNA ribossomal) a mais utilizada em pesquisas científicas por ser mais variável quando comparada a outras sequências do DNAr, facilitando assim a identificação espécie-específica (RIVERA et. al, 2015).

É notório que a identificação molecular apresenta maior sensibilidade e especificidade que as convencionais, como por exemplo, as baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex e em tempo real (pPCR). Entretanto, por ser mais onerosa, e por ser a criptococose uma das micoses de diagnóstico facilitado pelo característico neurotropismo, presença de blastoconídios no líquido e em lesões, além da facilidade na visualização da cápsula polissacarídica (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008), a identificação da levedura na rede de saúde pública do estado e em laboratórios de análises clínicas ainda é presuntiva e baseada em algumas das provas que utilizamos nesta pesquisa.

2.4 Tratamento

Os antifúngicos são bastante difundidos no tratamento da criptococose. Dentre os mais prescritos estão os polienos (p.ex.: anfotericina B), azólicos (p.ex.: fluconazol) e flucitosina (5-FC). A anfotericina B (MAZIARZ; PERFECT, 2016) é o mais eficiente contra a criptococose severa, incluindo a meningoencefalite criptocócica (MAY et al., 2016), pois além de comprometer a síntese do ergosterol (componente básico da parede celular fúngica) eleva a morte celular via estresse oxidativo (ANDERSON et al., 2014; BELENKY et al., 2013; GRAY et al., 2012) e apresenta um grau de nefrotoxicidade menor quando comparado com a de outros antifúngicos (HAMILL et al., 2010; LEENDERS et al., 1997; PERFECT et al., 2010).

A associação entre a anfotericina B e a flucitosina tem sido a primeira escolha para o tratamento da meningite criptocócica e criptococose pulmonar severa (BROUWER et al., 2004) com dosagem de 100 mg/kg/d fragmentadas em doses menores (DISMUKES et al., 1987; VAN DER HORST et al., 1997). Segundo Day et al. (2013) essa combinação é a que melhor resulta na chance de sobrevivência dos pacientes, entretanto a utilização da flucitosina é limitada devido ao custo elevado (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

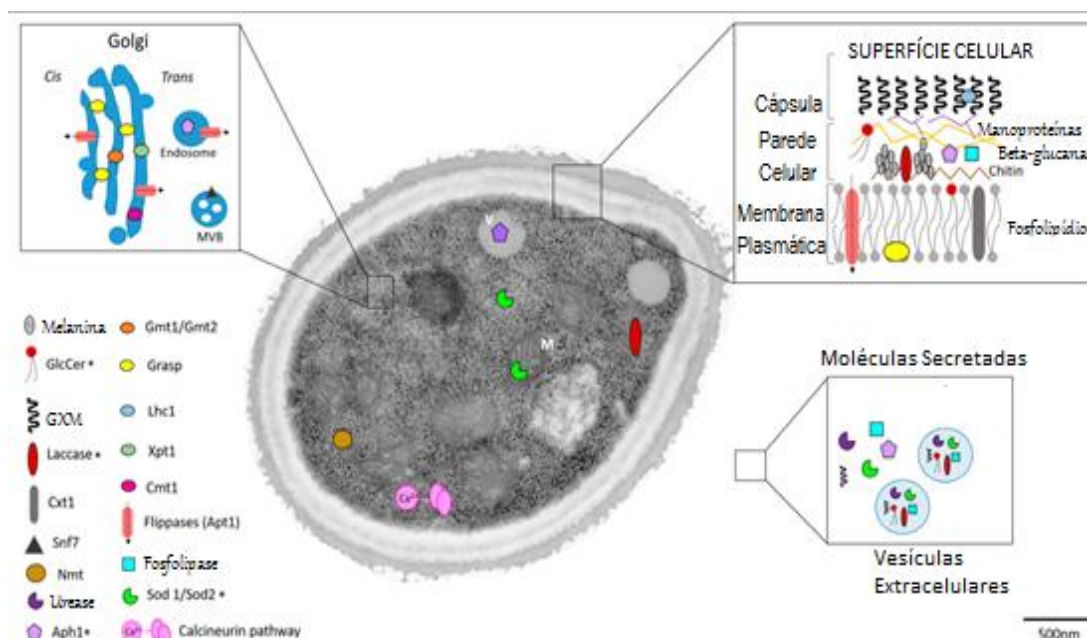
Mediante a tal limitação, uma terapia alternativa bastante utilizada, com menor custo e que tem mostrado resultados satisfatórios é a combinação da anfotericina B com o fluconazol (800 mg/d), embora haja relatados na literatura de casos de resistência ao azol em isolados clínicos (BONGOMIN et al., 2018). Dentre os benefícios clínicos após o tratamento foi

observado um aumento nas taxas de eliminação fúngica, recuperação neurológica e sobrevivência dos pacientes em comparação com a anfotericina B isolada ou em combinação com baixas concentrações de fluconazol (LOYSE et al., 2012; PAPPAS et al., 2009).

2.5 Fatores de Virulência

Assim como muitos micro-organismos patogênicos, *C. neoformans* e *C. gattii* expressam fatores de virulência que permitem a sua instalação no hospedeiro, sobrevivência (p.ex.: nutrição e contornar o SI do hospedeiro) e consequentemente o sucesso da infecção (PESSOA et al., 2012), como exemplo, a cápsula, capacidade de sobreviver a temperaturas mais elevadas sem ocorrer comprometimento das funções celulares vitais (termotolerância), produção de exoenzimas e melanina. Investigações aprofundadas sobre esses fatores de virulência podem prover informações importantes principalmente para a descoberta de potenciais alvos moleculares para o desenvolvimento de novos antifúngicos (AZEVEDO et al., 2016). Alguns desses alvos são mostrados na Figura 3, juntamente com os principais atributos de virulência da levedura.

Figura 3 - Esquema dos principais fatores de virulência presentes em *Cryptococcus* e localização celular dos alvos potenciais para antifúngicos para a terapia anticriptocócica.



Fonte: Adaptado de Azevedo et al. (2016).

2.5.1 Fenoloxidase - Produção de melanina

Produzida por muitos organismos, a melanina é uma macromolécula pigmentar, sintetizada a partir da oxidação de exoenzimas como a hidrolase fenoloxidase ou pela polimerização de compostos difenólicos (p.ex.: dihidroxifenilalanina ou L-DOPA) que desempenha diversas funções quando nos referimos à virulência microbiana, como por exemplo, modular a resposta do sistema imune inato nos hospedeiros vertebrados (CAMACHO et al., 2019, CORDERO et al., 2020). Alguns fungos podem apresentar deposição de melanina na parede celular (Figura 3), seja essa deposição temporária ou permanente (fungos dematiáceos), protegendo a célula contra agentes abióticos (p.ex.: radiação solar) e bióticos (p.ex.: redução de citocinas inflamatórias e radicais livres produzidos pelo sistema imune) (CAMACHO et al., 2019; TAJIMA et al., 2019).

Em *Cryptococcus* a deposição de melanina, assim como para outros micro-organismos, é importante para a modulação do sistema imune através de diversos mecanismos, como alteração do perfil pró-inflamatório que, conseqüentemente, reduz a fagocitose, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), além de reduzir a eficiência dos antifúngicos (HUFFNAGLE et al., 1995; WANG; CASADEVALL, 1994; WANG et al., 1995).

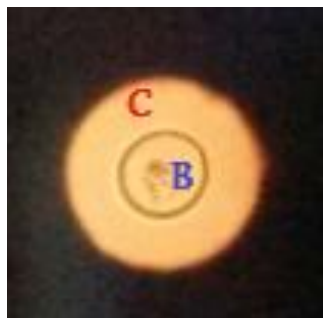
2.5.2 Cápsula polissacarídica

A cápsula que recobre a célula leveduriforme é constituída por polissacarídeos, principalmente glucoronoxilomanana (GXM) e glucoroxilogalactana (GXMGal) (BOSE, et al., 2003; CHERNIAK et al., 1982; CHERNIAK; SUNDSTORM, 1994).

Embora em menor quantidade, proteínas também estão presentes, como as manoproteínas (MP), as quais apresentam função de transporte (CHERNIAK; SUNDSTROM, 1994; JESUS et al., 2010; RODRIGUES; NIMRICHTER, 2012).

As funções da cápsula para sobrevivência do fungo têm sido suficientemente reportadas na literatura consultada, como: aderência ao substrato, dificuldade da chegada do antifúngico até o interior da levedura, função antifagocitária pelo SI, formação de biofilme e possivelmente proteção contra desidratação quando presente no ambiente (ALMEIDA et al., 2015; PESSOA et al., 2012).

Figura 4 - Cápsula característica de *Cryptococcus* sobre um fundo negro (exame direto com tinta da China) em uma amostra de líquido de paciente do HEHA com neurocriptococose. C= cápsula e B= blastoconídio.



Fonte: LabMicol – UFAL, 2016.

Além da sua importância na virulência, a cápsula é a base para a diferenciação de *C. neoformans* em quatro sorotipos: A (variedade *grubii*), AD (híbrido) e D (variedade *neoformans*); além de B e C (*C. gattii*) devido a diferenças na estrutura dos GXM (LIN; HEITMAN, 2006).

2.5.3 Termotolerância

Um dos parâmetros para que um micro-organismo seja considerado patogênico é a capacidade de crescimento e sobrevivência a 36-37°C, temperatura média corpórea humana. Da mesma forma, *Cryptococcus* patogênicos são capazes de crescer e instalar a infecção, sendo a temperatura fundamental para potencializar a expressão dos genes codificantes dos fatores de virulência (p.ex.: enzimas) (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

As aves, grupo que é o principal reservatório de *C. neoformans*, apresenta temperatura média de 42°C. Tal temperatura permite que o fungo se desenvolva sem causar infecção nesses animais, embora seja descrito na literatura que a temperatura não é o único fator que impede a instalação da infecção, mas sim a baixa capacidade de replicação de *Cryptococcus* dentro dos macrófagos desse grupo (JOHNSTON et al., 2016).

2.5.4 Fosfolipase

As fosfolipases são enzimas capazes de hidrolisar uma ou mais ligações de ésteres, que estão presentes nos glicerofosfolipídeos (componentes essenciais de membranas) (COX et al., 2001), podendo levar à lise celular e liberação de carreadores lipídicos (GHANNOUM, 2000; SCHMIEL; MILLER, 1999). Alguns fungos como *Candida albicans*, *Penicillium notatum* e *Saccharomyces cerevisiae* podem ser produtores de fosfolipase B, a qual apresenta mais de

uma atividade enzimática, como a liberação de ácidos graxos (hidrolase), a quebra do ácido lisofastídico (lisofosfolipase) e a adição de ácidos graxos (transacilase) (LEE et al., 1994; LEIDICH et al., 1998; SAITO et al., 1991).

Chen et al. (1997) reportaram que *C. neoformans* apresenta uma única fosfolipase extracelular que compartilha características semelhantes à fosfolipase B, lisofosfolipase e lisacofosfolipase transacilase. Em seus estudos, utilizando um modelo murino, os autores constataram que os ratos receptores de cepas com alta capacidade de produzir fosfolipase apresentaram um quadro infeccioso agravado, comparado à infecção nos ratos que receberam cepas com baixa capacidade de produção da enzima.

2.5.5 Urease

A metabolização do ácido úrico (importante antioxidante) é bem conservada em todos os organismos vivos. Alguns fungos, por exemplo, *Cryptococcus*, possuem a capacidade de expressar todas as enzimas catalíticas (ureato oxidase, alantoinase e urease) que reduzem o ácido úrico à amônia, a qual é mais facilmente absorvida e utilizada como fonte de energia (LEE et al., 2013).

O sangue, assim como excretas de aves, é rico em ácido úrico e ureia, a qual é liberada a partir de células mortas e que, além de servir como ativador do sistema imune inato e adaptativo (recrutamento de neutrófilos, linfócitos T citotóxicos e anticorpos) quando corpo está em perigo (BEHRENS et al., 2008), atuam como moduladores na ativação de fatores de virulência de *Cryptococcus*, por exemplo, e aumentam a expressão do gene codificante da urease e da produção de cápsula (LEE et al., 2011; LEE et al., 2013; STAIB et al., 1976).

Estudos em modelo murino demonstraram que infecções induzidas por cepas mutantes para o gene codificador da urease (inativação) resultaram em uma infecção mais branda e consequentemente uma maior sobrevivência, comparada à infecção em animais inoculados com cepas selvagens (COX et al., 2000; SHI et al., 2010). Além de ser importante na nutrição das leveduras, a urease apresenta importante papel na invasão tecidual, incluindo do SNC uma vez que aumentam a permeabilidade endotelial durante a disseminação hematogênica (COX et al., 2000; OLSZEWSKI et al., 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Descrever a produção de fatores de virulência *in vitro* de isolados de origem clínica e ambiental do complexo *Cryptococcus*: *C. neoformans* e *C. gattii* no estado de Alagoas.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar, *in vitro*, se *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* apresentam diferenças nos padrões de virulência;
- b) Verificar a atividade da exoenzima fenoxidase;
- c) Averiguar se há diferenças em relação à produção de cápsula mucopolissacarídica em isolados clínicos e ambientais;
- d) Investigar se *C. gattii* e *C. neoformans* apresentam igualmente a capacidade de crescimento a 37°C (termotolerância);
- e) Analisar a atividade da exoenzima fosfolipase;
- f) Classificar a intensidade da fosfolipase através do índice de atividade enzimática (Pz);
- g) Avaliar a atividade da exoenzima urease.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolados Testados

Foram utilizados nesse estudo 25 isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, de origem clínica (n=12) e ambiental (n=5), os quais estão armazenados na micoteca do Laboratório de Micologia (LabMicol) do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Para fins comparativos foram utilizados padrões moleculares (n=8) gentilmente cedidos pelas pesquisadoras Dras. Márcia Lazéra e Luciana Trilles do Laboratório de Micologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) - FIOCRUZ (RJ) (Quadro 1).

Quadro 1 - Isolados de *Cryptococcus* spp. obtidos de amostras clínicas e ambientais em Maceió-AL, com descrição da fonte de origem e dos genótipos e cepas de padrão molecular utilizadas para comparação das características fenotípicas.

ISOLADO	ESPÉCIE	ORIGEM DA AMOSTRA	GÉNOTIPOS*
CLÍNICA			
167	<i>Cryptococcus neoformans</i>	LÍQUOR	VNI
173.1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	LÍQUOR	VNI
173.2	<i>Cryptococcus neoformans</i>	LÍQUOR	VNI
121.1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	LÍQUOR	VNI
121.2	<i>Cryptococcus neoformans</i>	LÍQUOR	VNI
84	<i>Cryptococcus neoformans</i>	LÍQUOR	VNI
205	<i>Cryptococcus neoformans</i>	LÍQUOR	VNI
452	<i>Cryptococcus neoformans</i>	LÍQUOR	VNI
12	<i>Cryptococcus neoformans</i>	LÍQUOR	VNI
22	<i>Cryptococcus neoformans</i>	LÍQUOR	VNI
59	<i>Cryptococcus neoformans</i>	LÍQUOR	VNI
RS	<i>Cryptococcus neoformans</i>	LÍQUOR	VNI
AMBIENTAL			
#1-2	<i>Cryptococcus gattii</i>	OCO DE ÁRVORE	VGII
#3-2	<i>Cryptococcus neoformans</i>	OCO DE ÁRVORE	VNI
#7-1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	OCO DE ÁRVORE	VNI
#8-1	<i>Cryptococcus gattii</i>	OCO DE ÁRVORE	VGII
1#1#6	<i>Cryptococcus neoformans</i>	EXCRETAS DE POMBOS	VNIV
PADRÃO MOLECULAR[§]			
CEPA	ESPÉCIE	SOROTIPO	GENÓTIPO
WM 148	<i>Cryptococcus neoformans</i>	A	VNI
WM 626	<i>Cryptococcus neoformans</i>	A	VNII
WM 628	<i>Cryptococcus neoformans</i>	AD	VNIII
WM 629	<i>Cryptococcus neoformans</i>	D	VNIV
WM 179	<i>Cryptococcus gattii</i>	B	VGI
WM 178	<i>Cryptococcus gattii</i>	B	VGII
WM 175	<i>Cryptococcus gattii</i>	B	VGIII
WM 779	<i>Cryptococcus gattii</i>	C	VGIV

Fontes: * Fonseca (2017); [§] IPCE/FIOCRUZ - RJ (2013).

Os isolados clínicos foram provenientes de pacientes com suspeita de neurocriptococose, HIV-positivos e HIV-negativos, sete dos quais evoluíram para óbito, cujo diagnóstico foi baseado na revelação da cápsula mucopolissacarídica pela prova da tinta da China (TC), em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes que deram entrada no Hospital Escola Hélyvio Auto (HEHA), e obtidas por aprovação do Comitê de Ética Pesquisa (CEP) sob o número 19035713.0000.5013.

Os isolados ambientais foram coletados a partir de ocos de árvores e de excretas de pombos ressecadas localizadas em praças com circulação intensa de pessoas na cidade de Maceió, AL e estavam armazenados na micoteca do LabMicol a -20°C.

4.2 Estocagem

Os isolados foram semeados no meio ágar batata dextrose (BDA), incubados a 30° C por cinco dias e reativados para a obtenção de colônias viáveis. Em seguida foram semeados em ágar semente de Níger (ASN) a 25 °C por cinco dias, para confirmação da identidade das cepas. Após essa etapa, um inóculo da colônia de cada isolado foi semeado em criotubo plástico contendo o meio Skim Milk 20% e armazenado em freezer a - 20°C.

4.3 Avaliação dos Fatores de Virulência

4.3.1 Pesquisa de fenoxidase

A síntese de melanina a partir da fenoxidase é específica de *C. neoformans* e *C. gattii* (SIDRIM; MOREIRA, 1999). Para verificar a capacidade de produção do pigmento os isolados foram inoculados em triplicata em ASN (20 g de ágar-ágar, 400 mg de cloranfenicol, 100 g de semente de alpiste: *Phalaris canariensis* L., q.s.p. 1000 mL de água destilada) e incubados a 30°C por 5 dias, onde foi observado o desenvolvimento de colônias marrons. A cepa de *C. neoformans* (WM629) foi utilizada como controle positivo, e a de *Candida albicans* (#9002) como controle negativo.

4.3.2 Produção de cápsula polissacarídica

A presença da cápsula foi verificada utilizando o teste direto de tinta da China (TC) através do sistema lâmina-lamínula, onde uma pequena porção das colônias de cada isolado em crescimento no meio BDA foi transferida para uma lâmina. Posteriormente, foi acrescida à mesma uma gota do corante e em seguida a lamínula. Para a visualização da cápsula foi utilizado microscópio de luz com o aumento de 1.600X e efetuado o registro fotográfico. A cepa de *C. neoformans* (WM629) foi utilizada como controle positivo

4.3.3 Termotolerância

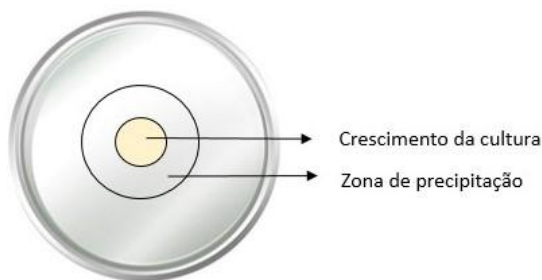
Várias espécies de leveduras patogênicas têm capacidade de crescer a 37°C, como as do gênero *Candida* sp., *Rhodotorula* sp., além de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* (SIDRIM; MOREIRA, 1999). Para análise da termotolerância as leveduras foram repicadas em tubos de ensaio contendo ASD inclinado e mantidas a 37°C por sete dias. No final do teste foi verificado se houve o crescimento fúngico e efetuado o registro fotográfico do resultado do experimento. A cepa de *C. neoformans* (WM629) foi utilizada como controle positivo.

4.3.4 Pesquisa de fosfolipase

A produção de fosfolipase foi verificada através da semeadura pontual em placas contendo ágar gema de ovo (ASD 65g, NaCl 57,3g, CaCl 0,57g, gema de ovo 80g, água destilada q.s.p. 1000 mL), como descrito por Price et al. (1982). O ensaio foi conduzido em triplicata a 30°C.

A formação de uma zona branca de precipitação (dc) ao redor das colônias indicou a produção da enzima (Figura 5).

Figura 5 - Esquema da produção de fosfolipase representada pela formação de um halo branco ao redor da colônia devido à precipitação de sais de cálcio em uma placa de Petri contendo meio de ágar gema de ovo.



Fonte: Elaborada pela autora.

A leitura dos resultados foi realizada após sete dias, com o auxílio de régua milimetrada. O índice de atividade (Pz) foi calculado como se segue:

$$Pz = \frac{dc}{dc + zp}$$

Onde:

Pz = Índice de atividade;

dc= diâmetro da colônia;

zp= zona de precipitação.

O índice de atividade foi analisado e classificado de acordo com a Tabela 1. Os dados completos do experimento estão disponíveis no Apêndice A, enquanto que o controle positivo foi representado pela cepa de *Cryptococcus neoformans* (WM629).

Tabela 1 - Classificação da atividade enzimática da fosfolipase em *Cryptococcus* spp. de fontes clínicas e ambientais de Alagoas, o índice e o código referente à sua atividade.

Pz	ATIVIDADE ENZIMÁTICA	CÓDIGO
1	NEGATIVA	1
$0,64 < Pz < 1,0$	POSITIVA	2
$Pz < 0,64$	FORTEMENTE POSITIVA	3

Fonte: Price et al. (1982).

4.3.5 Pesquisa de urease

Um inóculo de cada levedura foi semeado em triplicata em tubos contendo meio ureia-ágar-base (CHRISTENSEN, 1946). Uma alça com fragmentos da colônia pura foi depositada

na superfície do meio inclinado, com subsequente incubação a 30°C e observação durante sete dias. O resultado foi considerado positivo quando houve a mudança da cor amarela inicial do meio para rosa ou vermelho violeta, sendo a intensidade da coloração final indicativa do grau de hidrólise e da atividade da ureia. Uma cepa de *C. neoformans* (WM629) foi utilizada como controle positivo para o teste.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esquemas metodológicos para a identificação presuntiva do gênero *Cryptococcus* abrangem procedimentos de cultivo e bioquímicos, muitos dos quais são atributos de virulência avaliados nessa pesquisa. A relevância desses resultados é que, se a espécie for corretamente caracterizada, ações terapêuticas poderão ser priorizadas. Por exemplo, *C. gattii* induz à formação de criptococomas no pulmão e no cérebro mais comumente do que *C. neoformans* (CHEN et al., 2000), mas apesar da resposta dos pacientes aos antimicóticos ser mais lenta nessa espécie, estes apresentam melhor sobrevida do que os infectados com *C. neoformans* (SPEED; DUNT, 1995).

Os 25 isolados (clínicos, ambientais e padrões moleculares) foram submetidos a testes morfológicos (microscópicos e culturais) e bioquímicos visando à avaliação da produção de atributos típicos de virulência.

Em pesquisas anteriores efetuadas pela equipe do LabMicol foi constatado que *C. neoformans* foi a espécie mais prevalente no líquido cefalorraquidiano (LCR) dos pacientes avaliados, sendo o quadro clínico e epidemiológico predominante o de imunodepressão celular pelo HIV/AIDS, o que explicaria a maior frequência da espécie nas amostras clínicas avaliadas (Tabela 2). Vale salientar que os 12 isolados clínicos foram provenientes de 10 pacientes devido a recoletas, prática laboratorial comum para a monitoração da criptococose.

Tabela 2 - Isolados utilizados no estudo discriminados por espécie e origem de isolamento, clínica, ambiental ou da micoteca (padrões moleculares) do IPC, FioCruz-RJ.

Espécie	Origem			Micoteca FioCruz	Total
	Clínica	Ambiental			
		Oco de árvore	Excreta de pombo		
<i>Cryptococcus neoformans</i>	12	2	1	4	19
<i>Cryptococcus gattii</i>	0	2	0	4	6
Total	12	4	1	8	25

Fonte: Elaborada pela autora.

Ademais, *C. gattii* pode ocorrer na forma de surtos em animais e humanos ou ser endêmica e está preferencialmente associada a indivíduos imunocompetentes. Nesse estudo a espécie foi obtida apenas de fontes ambientais, quatro de matéria orgânica depositada em ocos de árvores e uma de excretas de pombos.

O perfil *in vitro* de atividade das exoenzimas, da produção de cápsula e de termotolerância está resumido na Tabela 3, cujo significado de cada atributo de virulência será apresentado e discutido adiante.

Todos os isolados foram caracterizados por cepas patogênicas e com a capacidade de causar a doença no hospedeiro humano, pois foram produtoras de cápsula, resistentes à temperatura de 37°C e produtoras das exoenzimas (hidrolases): fenoloxidase, fosfolipase e urease. Em relação à fosfolipase, a enzima foi adicionalmente avaliada através de níveis de atividade enzimática (Pz).

Tabela 3 - Descrição dos resultados dos testes realizados para produção dos fatores de virulência dos isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* estudados (n=25).

ISOLADOS	CÁPSULA	MELANINA	TERMO-TOLERÂNCIA	FOSFOLIPASE	UREASE
167	+	+	+	3	+
173.1	+	+	+	3	+
173.2	+	+	+	3	+
121.1	+	+	+	2	+
121.2	+	+	+	3	+
84	+	+	+	3	+
205	+	+	+	3	+
452	+	+	+	3	+
12	+	+	+	3	+
22	+	+	+	3	+
59	+	+	+	3	+
RS	+	+	+	3	+
#1-2	+	+	+	3	+
#3-2	+	+	+	3	+
#7-1	+	+	+	3	+
#8-1	+	+	+	3	+
1#1#6	+	+	+	3	+
WM 148	+	+	+	3	+
WM626	+	+	+	2	+
WM628	+	+	+	3	+
WM629	+	+	+	3	+
WM179	+	+	+	3	+
WM178	+	+	+	3	+
WM175	+	+	+	2	+
WM779	+	+	+	3	+

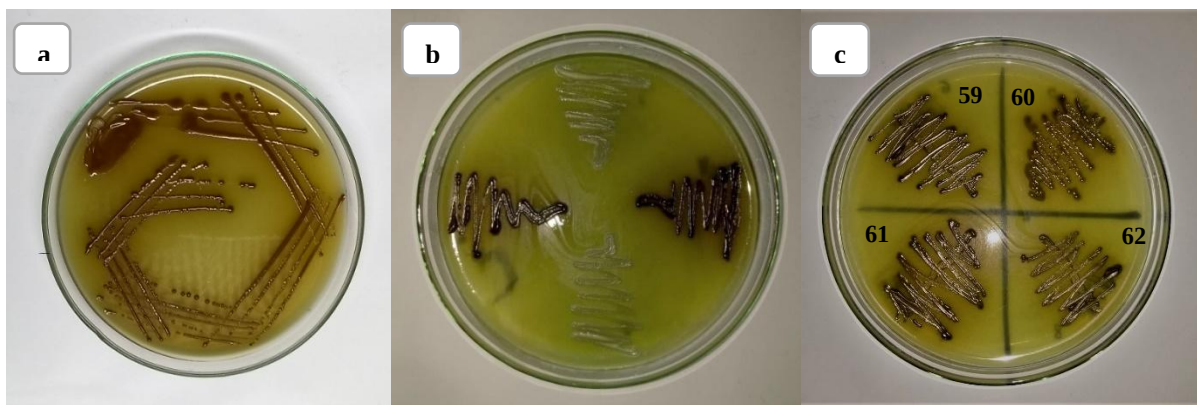
Legenda: Presença/positivo (+); Atividade enzimática positiva (2); Atividade enzimática fortemente positiva (3).

Fonte: Elaborada pela autora.

5.1 Pesquisa de Fenoloxidase

Todas as 25 cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* avaliadas quanto à atividade fenoloxidase e capacidade de produção de melanina em ASN foram positivas (Tabela 3). As colônias das leveduras apresentaram crescimento mucoide de coloração marrom, típica da presença dos pigmentos melanínicos (Figura 6).

Figura 6 – Fotografia de levedura cultivada em ágar semente de niger representando a produção de melanina após incubação a 30°C por 5 dias: a) colônias de uma cepa de *C. neoformans* (WM629); b) colônias escuras da mesma cepa de *Cryptococcus* produtoras de melanina e cremes de *Candida albicans* (ATCC 9002) não produtoras do pigmento; c) colônias de cepas de *C. gattii* WM 179 = 59, WM 178 = 60, WM 175 = 61 e WM 779 = 62.



A enzima fenoloxidase é responsável por catalisar a oxidação de compostos difenólicos em meios de cultura que contêm sementes de alpiste como substrato, produzindo dessa forma colônias escuras amarronzadas (IKEDA et al., 2002). Essa coloração ocorre devido à produção de melanina, um pigmento presente na parede celular de várias espécies fúngicas e que desempenha um importante papel protetor contra o estresse ambiental, como a radiação ultravioleta e temperaturas extremas, como também contra agentes antifúngicos, a saber: anfotericina B, azóis e caspofungina (IKEDA et al., 2003; MARTINEZ; CASADEVALL, 2006; VAN DUIN et al., 2002).

Gomes et al. (2010) avaliando o mesmo fator de virulência em 15 isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* oriundos de pacientes com meningite criptocócica no estado do Pará, também verificaram a produção de melanina em todas as amostras estudadas, resultados equivalentes ao presente estudo.

Da mesma forma, Brilhante et al. (2017) avaliaram a produção do pigmento melanínico em 13 isolados das duas espécies e obtidos da coleção de fungos do Centro de Micologia

Médica Especializada da Universidade Federal do Ceará e constataram também a produção de colônias com pigmentos marrons em todas as cepas patogênicas.

Os resultados obtidos nesse ensaio reforçam a teoria que em isolados de origem ambiental, a melanina confere uma maior resistência do fungo às condições externas (radiação ultravioleta e dessecação), enquanto que nos isolados clínicos a melanina atua contra o ataque de células imunológicas efectoras do hospedeiro.

Além disso, as espécies do complexo têm tropismo pelo SNC, contribuindo para a meningoencefalite característica da criptococose e capazes de converter os neurotransmissores do SNC (catecolaminas, dopamina, norepinefrina, e epinefrina) em melanina (NOSANCHUK et al., 2000).

Considerando que a melanina está ligada à patogênese da doença, a enzima constitui importante fator de virulência, sendo, desta forma, recomendada a avaliação da presença do pigmento através do crescimento da levedura em ASN na rotina laboratorial de identificação fúngica (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008). Além disso, a experiência obtida nessa pesquisa comprovou a praticidade e o baixo custo do teste.

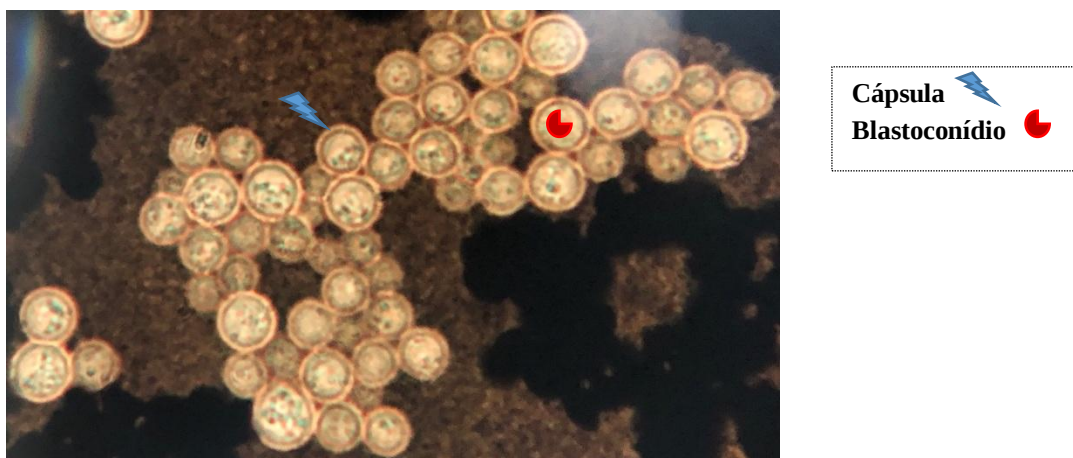
5.2 Produção de Cápsula Polissacarídica

A detecção de um fungo e de seus componentes capsulares em uma amostra biológica é de alta relevância para o diagnóstico, uma vez que demonstra a sua presença no tecido, permitindo o início do tratamento (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008; O'MEARA; ALSPAUGH, 2012).

A presença da cápsula polissacarídica é considerada um teste presuntivo para o gênero e foi um dos primeiros fatores de virulência a serem identificados em *C. neoformans* e *C. gattii*, sendo responsável pela redução da resposta de anticorpos no hospedeiro, inibir a fagocitose e também a migração de leucócitos no hospedeiro (ZARAGOGA et al., 2010), sendo necessária, portanto, a sua visualização em testes de rotina laboratoriais nos isolados para uma melhor compreensão do seu potencial patogênico.

Todos os isolados avaliados nesse estudo foram produtores de cápsula polissacarídica (Tabela 3) recobrimo os conídios (blastocónídios), mas de espessura delgada, a qual pode ser visualizada na Figura 7.

Figura 7 - Fotomicrografia de luz de blastoconídios e cápsula de espessura delgada de isolado clínico *Cryptococcus neoformans* (amostra LCR 167) em preparação de tinta da China.



No estudo realizado em Belém do Pará por Gomes et al. (2010) com 15 amostras clínicas recuperadas de pacientes com meningite criptocócica por *C. neoformans* e *C. gattii*, foi verificada também a presença da cápsula em ambas as espécies.

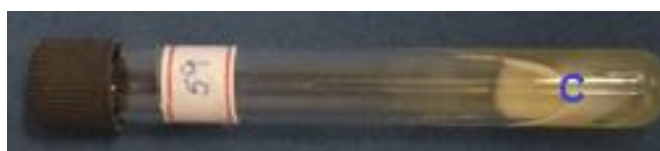
Souza (2016) estudando também esse fator de virulência *in vitro* em amostras ambientais de excretas de pombos no estado de Santa Catarina, verificaram a produção da cápsula em todos os 17 isolados de *Cryptococcus* sp.

Cepas de *Cryptococcus* acapsuladas já foram descritas como avirulentas destacando-a como um dos principais atributos de virulência da levedura, sendo uma importante característica no diagnóstico da criptococose, uma vez que a visualização da mesma em lâmina permite a identificação do agente da doença e consequentemente o início imediato do tratamento (ZARAGOZA et al., 2010).

5.3 Termotolerância

Foi verificado o crescimento dos 25 isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* avaliados, cujas colônias são mucoides e de tonalidade creme (Figura 8) característica do gênero *Cryptococcus* sp. (CONSENSO DE CRIPTOCOCOSE, 2008).

Figura 8 - Colônias (C) de *Cryptococcus gattii* (WM179 = 59) em meio ASD exibindo a tonalidade creme e textura mucoide após incubação por sete dias a 37°C.



Da mesma forma, Júnior et al. (2013), avaliando a termotolerância de isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* e *C. gattii* em diferentes temperaturas, verificaram um ótimo crescimento das cepas a 37°C, sugerindo que essa temperatura foi um eficiente indicador de patogenicidade.

Matos (2011) também avaliou a termotolerância de 62 isolados clínicos das duas espécies e verificou crescimento em 100% dos fungos a 37°C, resultado em concordância com o do presente trabalho. O mesmo resultado foi obtido por Souza (2016), em amostras ambientais de *Cryptococcus* sp. em Santa Catarina.

O estudo da termotolerância em *Cryptococcus* sp. é essencial para uma melhor compreensão da patogênese da criptococose, uma vez que esse atributo permite a sobrevivência do fungo a 37°C em mamíferos, facilitando também o desenvolvimento de micoses sistêmicas no hospedeiro (CASADEVALL; STEENBERG, 2003).

Em geral, a criptococose está associada a *C. neoformans* (PETTER et al., 2001; COELHO et al., 2014), porém, no presente estudo foram observados isolados de *C. gattii* também termotolerantes, comprovando que, apesar de possuírem origem ambiental, também apresentam potencial e capacidade para colonizar e gerar a infecção em mamíferos, inclusive em humanos.

A termotolerância em amostras ambientais de *C. gattii* pode ter surgido como resultado de seleção ambiental devido ao aquecimento global (GARCIA; CASADEVALL, 2010), o que chama atenção para o possível surgimento de novos patógenos fúngicos devido à capacidade de crescerem em temperatura semelhante a dos mamíferos.

5.4 Produção de Fosfolipase

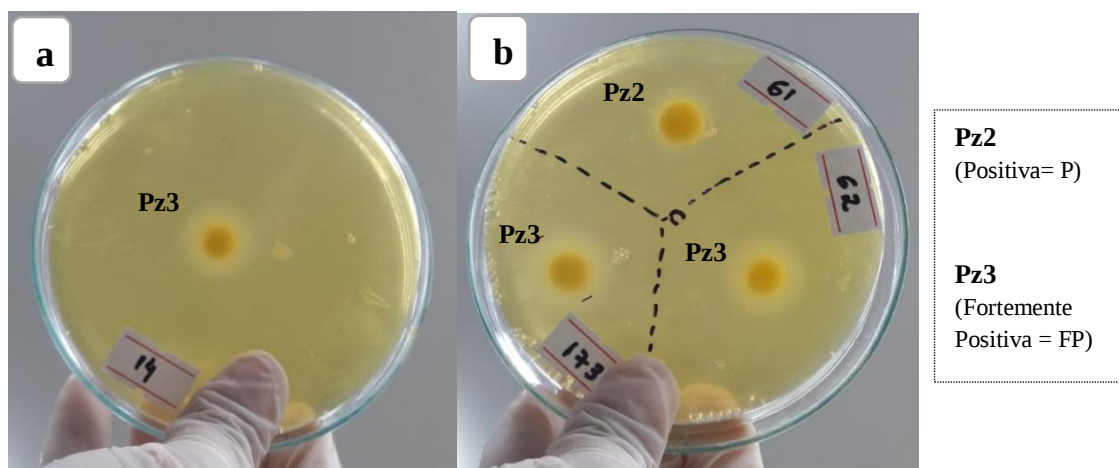
Todos os 25 isolados foram positivos (Tabela 3) e devidamente categorizados quanto à atividade fosfolipase (Tabela 4, Figura 9 e Apêndice A). No grupo das amostras clínicas, 11/12 (91,6%) apresentaram atividade fortemente positiva (código Pz= 3) e 1/12 (8,4%) apresentaram atividade positiva (P, código Pz=2). Já no grupo das amostras ambientais todas (5/5) apresentaram atividade fortemente positiva (FP, código 3).

Tabela 4 - Atividade enzimática das cepas clínicas, ambientais e de padrões moleculares de *C. neoformans* e *C. gattii* (n=25) conforme a classificação pelo índice Pz e o código.

ORIGEM	ISOLADOS	ESPÉCIE	CÓDIGO (Pz)	ATIVIDADE ENZIMÁTICA
CLÍNICA (n=12)	167	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3	FORT. POSITIVA
	173.1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3	FORT. POSITIVA
	173.2	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3	FORT. POSITIVA
	121.1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	2	POSITIVA
	121.2	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3	FORT. POSITIVA
	84	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3	FORT. POSITIVA
	205	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3	FORT. POSITIVA
	452	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3	FORT. POSITIVA
	12	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3	FORT. POSITIVA
	22	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3	FORT. POSITIVA
	59	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3	FORT. POSITIVA
	RS	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3	FORT. POSITIVA
AMBIENTAL (n=5)	#1-2	<i>Cryptococcus gattii</i>	3	FORT. POSITIVA
	#3-2	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3	FORT. POSITIVA
	#7-1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3	FORT. POSITIVA
	#8-1	<i>Cryptococcus gattii</i>	3	FORT. POSITIVA
	1#1#6	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3	FORT. POSITIVA
PADRÃO MOLECULAR (n=8)	WM 148	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3	FORT. POSITIVA
	WM626	<i>Cryptococcus neoformans</i>	2	POSITIVA
	WM 628	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3	FORT. POSITIVA
	WM 629	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3	FORT. POSITIVA
	WM 179	<i>Cryptococcus gattii</i>	3	FORT. POSITIVA
	WM 178	<i>Cryptococcus gattii</i>	3	FORT. POSITIVA
	WM 175	<i>Cryptococcus gattii</i>	2	POSITIVA
	WM 779	<i>Cryptococcus gattii</i>	3	FORT. POSITIVA

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 9 - Fotografias representativas da zona de precipitação de cristais de cálcio resultante da ação fosfolipásica em quatro cepas de *Cryptococcus*: a) *C. neoformans* de fonte ambiental #3-2 = 14, com código Pz 3 (FP); b) *C. gattii* dos padrões moleculares WM 175 = 61 e WM 779 = 62, com código Pz 2 (P) e Pz 3 (FP), respectivamente e *C. neoformans* 173 de fonte clínica, com código Pz 3 (FP).



Analisando por espécie, a enzima apresentou atividade mais elevada (FP) nos isolados de *C. neoformans* (n=17/19; 89,5%) em comparação com *C. gattii* (n=5/6; 83,3%). Considerando que não foram avaliadas cepas clínicas de *C. gattii*, não foi possível comparar a ação da exoenzima em relação a *C. neoformans*. Da mesma forma, todos os isolados ambientais dessa espécie (n= 6) apresentaram atividade enzimática FP, enquanto que nos padrões moleculares não houve diferença entre as atividades das duas espécies (75% FP e 25% P).

As fosfolipases, grupo heterogêneo de enzimas produzidas por várias bactérias e fungos, estão relacionadas com a patogenicidade desses micro-organismos. Elas podem causar danos às membranas celulares hospedeiras resultando na desestabilização das membranas, lise celular e liberação de segundos mensageiros lipídicos. Além disso, esse grupo de enzimas também é responsável pelo início da infecção pulmonar, facilitando a adesão dos esporos às células epiteliais do pulmão e contribuindo para patogênese da criptococose (GHANNOUM, 2000; PINI et al., 2017; SCHMIEL; MILLER, 1999).

Cardoso et al., (2018a) avaliando amostras clínicas de pacientes com meningite e ambientais (excretas de pombos) em São Paulo, obtiveram resultados semelhantes com o deste estudo em relação aos isolados clínicos de *C. neoformans*, onde 89% (32/36) foram fortemente positivos e 5,5% (2/36) positivos, apesar de 5,5% (2/36) não apresentarem atividade fosfolipídica. Já os isolados ambientais diferiram apenas no grau de atividade, uma vez que 52,4% (22/42) apresentaram atividade fortemente positiva e 47,6% (20/42) atividade positiva.

Cardoso et al. (2018b) realizaram outro estudo com amostras de várias regiões do Brasil, em que dos 40 isolados clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii* (LCR e sangue) 92,5% (37/40) foram fortemente positivos, 2,5% (1/40) positivos e 5,0% (2/40) negativos. Enquanto que dos 44 isolados ambientais (excretas de pombos) das duas espécies 54,5% (24/44) foram fortemente positivos e 45,5% (20/44) positivos.

Sendo assim, os resultados do presente estudo estão de acordo com o que tem sido reportado nas outras pesquisas supracitadas, em relação aos isolados de origem clínica e ambiental, pois todos apresentaram atividade fosfolipídica variando de positiva a fortemente positiva. Entretanto, diferenças em ensaios *in vitro* são passíveis de ocorrer uma vez que variações na produção da enzima podem decorrer de alterações nos meios de cultivo, e por serem enzimas serina-proteases são dependentes de íons de Ca e Mg e mais ativas entre pH 7,5 e 8,5 (AOKI et al.,1994).

5.5 Produção de Urease

A produção de urease no meio ágar ureia de Christensen foi detectada em todos os 25 isolados, como pode ser visto na Figura 10, cujo isolado selecionado apresentou coloração rosa devido à hidrólise da ureia (U+).

Figura 10 - Teste de produção da urease em isolado de *C. neoformans* (amostra167) em ágar ureia de Christensen. (U+) Amostra positiva (LCR167); (C-) controle negativo sem inoculação do meio.



A urease é uma metaloenzima que catalisa a hidrólise de ureia em amônia e carbamato e sob condições fisiológicas essa reação resulta em aumento do pH e é um fator patogênico importante para muitos micro-organismos (CASADEVALL; STEENBERGEN, 2003)

Gomes et al. (2010) em um estudo realizado no Estado do Pará obtiveram resultado positivo para a produção da urease em todos os 15 isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* estudados.

Abegg et al. (2006) avaliando o mesmo fator de virulência em amostras coletadas no Jardim Zoológico de Sapucaia do Sul, estado do Rio Grande do Sul, também verificaram a

produção da enzima em todos os 38 isolados ambientais das duas espécies, resultados equivalentes ao do presente estudo.

Da mesma forma, Júnior et al. (2013) em um estudo realizado em Sergipe, além de terem observado a presença da enzima em 100% dos isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*, verificaram também que todas as cepas hidrolisaram rapidamente a ureia, independente da origem clínica ou ambiental.

Em um experimento relevante, Perfect et al. (2000) observaram que nas cepas de *C. neoformans*, cujo gene para produção da urease foi inativado, a falta da atividade hidrolítica da enzima diminuiu a patogenicidade do isolado e consequentemente a virulência da cepa.

A urease é um fator de virulência presente em diversos patógenos fúngicos, como *C. neoformans* e *C. gattii*, bem como em outros micro-organismos. A reação catalisada pela urease ou hidrólise da ureia pode favorecer a invasão de *C. neoformans* ao sistema nervoso central, além de servir como fonte nutricional para o fungo no hospedeiro (OLSZEWSKI et al. 2004; SHI et al., 2010).

Sendo assim, a positividade da urease em todos os isolados desse estudo confirma a enzima como um importante atributo de virulência na patogênese da criptococose.

Complementando, o objetivo principal do trabalho foi o de avaliar *in vitro* a atividade de exoenzimas (fenoloxidase, fosfolipase e urease) e outros fatores de importância para a virulência do complexo patogênico *Cryptococcus*: *C. gattii* e *C. neoformans*, como a termotolerância e a presença de cápsula. É importante destacar que os isolados das duas espécies do complexo foram submetidos às mesmas condições de cultivo e apesar das diferenças das fontes de origem, se clínica ou ambiental, foram todas virulentas, entretanto demonstraram visualmente menor capacidade de expressar a cápsula do que amostras provenientes de LCR.

Pretende-se com investigações posteriores avaliar nesses isolados a produção de biofilme criptocócico e a sua relação com a suscetibilidade antifúngica, medir a espessura da cápsula de cepas de origem líquórica e pós-cultivo *in vitro* e determinar a sua capacidade hemolítica em sangue de carneiro a 5%.

6 CONCLUSÕES

- a) Apesar de *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans* responderem diferentemente aos principais antimicóticos indicados na terapia da criptococose, as espécies apresentaram padrões de virulência semelhantes;
- b) Não houve diferença visual em relação à espessura da cápsula dos isolados das duas espécies, independente se provenientes de fontes clínicas ou ambientais;
- c) Os isolados das duas espécies do complexo *Cryptococcus* apresentaram capacidade de crescimento à temperatura de 37°C, reforçando a sua condição patogênica;
- d) Todos os isolados produziram as exoenzimas: fenoloxidase, urease e fosfolipase;
- e) A fosfolipase apresentou intensidade moderadamente elevada em *C. neoformans*, sendo esse provavelmente o primeiro relato de atividade exoenzimática da enzima em isolados de Alagoas;
- f) É possível que a ação das exoenzimas, da presença da cápsula polissacarídica e a capacidade de sobreviver a altas temperaturas tenham permitido aos isolados analisados sobreviverem no ambiente (ocos das árvores e excretas de pombos), como também no LCR dos pacientes com neurocriptococose.
- g) A produção simultânea desses determinantes de virulência sugere que isolados de alta virulência de *C. gattii* e *C. neoformans* estão circulando no estado de Alagoas.

REFERÊNCIAS

- ABEGG, M. A. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of Psittaciformes in a Southern Brazilian Zoological Garden. **Mycopathologia**, v.161, n. 2, p. 83-91, 2006.
- ALMEIDA, F.; WOLF, J. M.; CASADEVALL, A. Virulence-Associated Enzymes of *Cryptococcus neoformans*. **Eukariotic Cell**, v. 14, p. 1173-1185, 2015.
- ANDERSON, T. M. et al. Amphotericin forms na extramembranous and fungicidal sterol sponge. **Nat. Chem. Biol.**, v. 10, p. 400-406, 2014.
- AOKI, S.; ITO-KUWA, S.; NAKAMURA K. et al. Extracellular proteolytic activity of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**. v. 128, p. 143-50. 1994.
- AZEVEDO, R. V. D. M.; RIZZO, J.; RODRIGUES, M. L. Virulence Factors as Targets for Anticryptococcal Therapy. **J. Fungi** . v. 2, n.4, p. 1-15, 2016.
- BEHRENS, M. D. et al. The endogenous danger signal, crystalline uric acid, signals for enhanced antibody immunity. **Blood**, v. 111, p. 1472-1479, 2008.
- BELENKY, P.; CAMACHO, D.; COLLINS, J. J. Fungicidal drugs induce a common oxidative-damage cellular death pathway. **Cell Rep.**,v. 3, p. 350-358, 2013.
- BONGOMIN, F. et al. A systematic review of fluconazole resistance in clinical isolates of *Cryptococcus* species. **Mycoses**, v.61, p. 290-297, 2018.
- BOSE, I. et al. A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 2, p. 655-663, 2003.
- BRILHANTE, R. S. N. et al. An alternative method for the analysis of melanin production in *Cryptococcus neoformans* sensu lato and *Cryptococcus gattii* sensu lato. **Mycoses**, v. 60, n. 10, p. 697-702, 2017.
- BROUWER, A. E. et al. Combination antifungal therapies for HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomised trial. **Lancet**, v. 363, p. 1764-1767, 2004.
- CAMACHO, E. et al. The structural unit of melanin in the cell wall of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **J. Biol. Chem.**, v. 294, n. 27, p. 10471-10489, 2019.
- CARDOSO, P. H. M. et al. Biosynthesis of phospholipases and proteinases using clinical and environmental strains of *Cryptococcus neoformans*. **Clin. Lab. Res. Den.**, p. 1-5, 2018a.
- CARDOSO, P. H. M. et al. Characterization of Clinical and Environmental Isolates of *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* Complex Maintained in Yeast Culture Collection in São Paulo, Brazil. **Open Journal of Epidemiology**, v. 08, n. 02, p. 76-92, 2018b.

- CASADEVALL, A.; STEENBERGEN, J. N. The origin and maintenance of virulence for the human pathogen fungus *Cryptococcus neoformans*. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 667-75, 2003.
- CHEN, S. C. et al. Identification of extracellular phospholipase B, lysophospholipase, acyltransferase produced by *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 405-41, 1997.
- CHEN, S.; SORREL, T.; SPEED, B. et al. Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* em Australia and New Zeland. Australian Cryptococcal Study Group. **Clin. Infect. Dis.**, vol. 31, p. 499-508, 2000.
- CHEN, S. C. A.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. *Cryptococcus gattii* infections. **Clinical microbiology reviews**, v. 27, n. 4, p. 980-1024, 2014.
- CHERNIAK, R.; REISS, E.; TURNER, S. H. A galactoxylomannan antigen of *Cryptococcus neoformans* serotype A. **Carbohydr. Res.**, v. 103, p. 239-250, 1982.
- CHERNIAK, R.; SUNDSTROM, J. B. Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 62, p.1507-1512, 1994.
- CHRISTENSEN, W. B. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. **J. Bacteriol.**, v. 52, P. 461-466, 1946.
- CHRISTIANSON, J.; ENGBER, W.; ANDES, D. Primary cutaneous cryptococcosis in immunocompetent and immunocompromised hosts. **Med. Mycol.**, v.41, n. 3, p. 177-88, 2003.
- COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. A. The tools for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 87, p. 1-41, 2014.
- CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 41, p. 524-544, 2008.
- CORDERO, R. J. B.; CAMACHO, E.; CASADEVALL, A. Melanization in *Cryptococcus neoformans* Requires Complex Regulation. **American Socie. Micro.**, v. 11, n. 1, p. 1-4, 2020.
- COX, G. M. et al. Extracellular phospholipase activity is a virulence fator for *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v. 39, n.1, p. 166-175, 2001.
- COX, G. M. et al. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infect Immun.**, v. 68, n. 2, p. 443-448, 2000.
- DAY, J. N. et al. Combination antifungal therapy for cryptococcal meningitis. **N. Engl. J. Med.**, v. 368, p. 1291-1302, 2013.
- DISMUKES, W. E. et al. Treatment of cryptococcal meningitis with combination amphotericin B and flucytosine for four as compared with six weeks. **N. Engl. J. Med.**, v. 317, p. 334-334, 1987.

GARCIA-SOLACHE, M. A.; CASADEVALL, A. Global warming will bring new fungal diseases for mammals. **mBio**, v.1, n.1, p. 1-3, 2010.

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

GOMES, F. S. et al. Chemotype determination and phenotypic characterization of isolated *Cryptococcus* from Belém, Pará State, Brazil. **Rev. Pan-Amaz. Saude**, v. 1, n. 4, p. 43-49, 2010.

GRAY, K. C. et al. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 109, p. 2234-2239, 2012.

HAMILL, R. J. et al. Comparison of 2 doses of liposomal amphotericin B and conventional amphotericin B deoxycholate for treatment of AIDS-associated acute cryptococcal meningitis: a randomized, double-blind clinical trial of efficacy and safety. **Clin. Infect. Dis.**, v. 51, n. 2, p. 225-32, 2010.

HUFFNAGLE, G. B. et al. Down-regulation of the afferent phase of T cell mediated pulmonary inflammation and immunity by a high melanin-producing strain of *Cryptococcus neoformans*. **J. Immunol.**, v. 155, p. 3507-3516, 1995.

IKEDA, R. et al. Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. **Microbiol. Immunol.**, v. 47, n. 4, p. 271-277, 2003.

IKEDA, R. et al. Lacase and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n. 4, p.1214-1218, 2002.

JESUS, M. D. et al. Glucuronoxylomannan, galactoxylomannan, and mannoprotein occupy spatially separate and discrete regions in the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Virulence**, v. 1, n. 6, p. 500-508, 2010.

JOHNSTON, S. A.; VOELZ, K.; MAY, R. C. *Cryptococcus neoformans* Thermotolerance to Avian Body Temperature Is Sufficient For Extracellular Growth But Not Intracellular Survival In Macrophages. **Scientific Reports**, 2016.

JÚNIOR, A. M. B. et al. Biological activity of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from clinical and environmental isolates. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.49, n.3, p. 160-168, 2013.

KNOW-CHUNG, K. J.; SAIJO, T. Is *Cryptococcus gattii* a primary pathogen? **J. Fungi**, v.1, n. 2, p.154-167, 2015.

LEE, I. R. et al. Characterization of the complete uric acid degradation pathway in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Plos One**, v. 8, n. 5, p. 1-13, 2013.

LEE, I. R. et al. Nitrogen metabolite repression of metabolism and virulence in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Genetics**, v. 188, n. 2, p. 309-323, 2011.

LEE, K.S. et al. The *Saccharomyces cerevisiae* PLB1 gene encodes a protein required for lysophospholipase and phospholipase B activity. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 31, p. 19725-19730, 1994.

LEENDERS, A. C. et al. Liposomal amphotericin B (AmBisome) compared with amphotericin B both followed by oral fluconazole in the treatment of AIDS-associated cryptococcal meningitis. **AIDS**, v.11, n. 12, p. 1463-1471, 1997.

LEIDICH, S.D. et al. Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene invvded in the pathogenicity of *Candida albicans*. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 40, p. 26078-26086, 1998.

LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annu. Rev. Microbiol.**, vol. 60, n.1, p. 69–105, 2006.

LOYSE, A. et al. Comparison of the early fungicidal activity of high-dose fluconazole, voriconazole, and flucytosine as second-line drugs given in combination with amphotericin B for the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 54, p. 121-128, 2012.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 50, p. 1021-1033, 2006.

MATOS, C. S. **Caracterização fenotípica e genotípica de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. no Estado da Bahia**. 2011. 100 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia)-Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, 2011.

MAY, R. C. et al. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature**, v. 14, p. 106-117, 2016.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 30, n. 1, p. 179-206, 2016.

MCTAGGART, L. et al. Rapid identification of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, *C. neoformans* var. *neoformans*, and *C. gattii* by use of rapid biochemical tests, differential media, and DNA sequencing. **Jour. Clin. Micro.**, v. 49, p. 2522-2527, 2011.

NOSANCHUK, J.D.; ROSAS, A.L.; LEE, S.C et al. Melanisation of *Cryptococcus neoformans* in human brain tissue. **Lancet**, v.355, p. 2049–2050, 2000.

O'MEARA, T. R.; ALSPAUGH, J. A. The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 25, p. 387-408, 2012.

OLSZEWSKI, M. A et al. A expressão de urease por *Cryptococcus neoformans* promove o sequestro microvascular, aumentando a invasão do sistema nervoso central. **Am. J. Pathol.**, v.164, p. 1761-1771, 2004.

PAPPAS, P. G. et al. A phase II randomized trial of amphotericin B alone or combined with fluconazole in the treatment of HIV associated cryptococcal meningitis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 48, p. 1775-1783, 2009.

PERFECT, J. R. et al. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 2, p. 443-448, 2000.

PERFECT, J. R. et al. Clinical practice guide lines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Disease Society of America. **Clin. Infect. Dis.**, v. 50, p. 291-322, 2010.

PESSOA, C. C. B. et al. Produção de fatores de virulência *in vitro* por isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* de origem clínica em Belém, Estado do Pará, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, v.3, n.2,p. 59-65 2012.

PETTER, R. et al. A survey of heterobasidiomycetous yeasts for the presence of the genes homologous to virulence factors of *Filobasidiella neoformans*, CNLAC1 and CAP59. **Microbiology**, v. 147, p. 2029-2036, 2001.

PINI, G.; FAGGI, E.; CAMPISI, E. Enzymatic characterization of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* strains isolated in Italy. **Rev Iberoam Micol.** v.34, n. 2, p. 77-82, 2017.

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

RIVERA, V. et al. Validation and clinical application of a molecular method for the identification of *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* complex DNA in human clinical specimens. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 19, n. 6, p. 563-570, 2015.

RODRIGUES, M. L.; NIMRICHTER, L. In good company: association between fungal glycans generates molecular complexes with unique functions. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 249, p. 1-5, 2012.

SAITO, K.; SUGATANI, J.; OKUMURA, T. Phospholipase B from *Penicillium notatum*. **Methods Enzymol.**, v. 197, p. 446-456, 1991.

SCHMALZLE, S. A. et al. *Cryptococcus neoformans* infection in malignancy. **Mycoses**, v. 59, p. 542-552, 2016.

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

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais de micologia médica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SHI, M. et al. Imagem em tempo real da captura e transmigração dependente de urease de *Cryptococcus neoformans* no cérebro de camundongos. **J. Clin. Invest.**, v. 120, p. 1683-1693, 2010.

SMITH, N.; SEHRING, M.; CHAMBERS, J.; PATEL, P. Perspectives on non-*neoformans* cryptococcal opportunistic infections. **Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives**, v. 7, n. 4, p. 214-217, 2017.

SOUZA, A. L. **Análise fenotípica e genotípica de *Cryptococcus*, isolados de amostras ambientais do município de Lages**. 2016. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 2016.

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

STAIB, F. et al. A. Growth of *Cryptococcus neoformans* on uric acid agar. **Zentralbl Bakteriol. Orig. A.**, v. 236, p. 374-385, 1976.

TAJIMA, K. et al. Solubilized melanin suppresses macrophage function. **FEBS Open Bio**, v. 9, p. 791-800, 2019.

VAN DER HORST, C. M. et al. Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired immunodeficiency syndrome. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group and AIDS Clinical Trials Group. **N. Engl. J. Med.**, v. 337, p. 15-21, 1997.

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 46, p. 3394-3400, 2002.

VIDAL, J. E.; BOULWERE, D. R. Lateral flow assay for cryptococcal antigen: an important advance to improve the continuum of HIV care and reduce cryptococcal meningitis-related mortality. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 57, n. 19, 2015.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-dopa decreases its susceptibility to amphotericin B. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 38, p. 2648-2650, 1994.

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

WILLIAMSON et al. Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. **Nature**, v. 13, p. 13-24, 2017.

ZARAGOZA, O. et al. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Applied Microbiology**, v. 2164, n. 9, p. 1-64, 2010.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Índice de atividade enzimática das cepas clínicas e ambientais de *C. neoformans* e *C. gattii* (n=25).

ORIGEM	ISOLADOS	ESPÉCIE	A	B	C	MÉDIA	ATIVIDADE ENZIMÁTICA
CLÍNICA (n=12)	167	<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,59	0,45	0,5	0,51	FORT. POSITIVA
	173.1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,71	0,55	0,5	0,58	FORT. POSITIVA
	173.2	<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,566	0,625	0,63	0,6	FORT. POSITIVA
	121.1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,83	0,55	0,72	0,7	POSITIVA
	121.2	<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,54	0,41	0,45	0,46	FORT. POSITIVA
	84	<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,5	0,42	0,4	0,44	FORT. POSITIVA
	205	<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,55	0,625	0,5	0,55	FORT. POSITIVA
	452	<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,5	0,5	0,5	0,5	FORT. POSITIVA
	12	<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,5	0,5	0,5	0,5	FORT. POSITIVA
	22	<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,45	0,55	0,44	0,48	FORT. POSITIVA
	59	<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,56	0,57	0,47	0,53	FORT. POSITIVA
	RS	<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,625	0,5	0,68	0,6	FORT. POSITIVA
AMBIENTAL (n=5)	#1-2	<i>Cryptococcus gattii</i>	0,71	0,57	0,6	0,63	FORT. POSITIVA
	#3-2	<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,625	0,56	0,54	0,58	FORT. POSITIVA
	#7-1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,55	0,5	0,45	0,5	FORT. POSITIVA
	#8-1	<i>Cryptococcus gattii</i>	0,55	0,4	0,41	0,45	FORT. POSITIVA
	1#1#6	<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,472	0,57	0,38	0,47	FORT. POSITIVA
PADRÃO MOLECULAR (n=8)	WM 148	<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,57	0,535	0,45	0,51	FORT. POSITIVA
	WM626	<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,83	1	0,71	0,84	POSITIVA
	WM 628	<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,71	0,55	0,45	0,57	FORT. POSITIVA
	WM 629	<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,55	0,45	0,66	0,55	FORT. POSITIVA
	WM 179	<i>Cryptococcus gattii</i>	0,7	0,5	0,63	0,61	FORT. POSITIVA
	WM 178	<i>Cryptococcus gattii</i>	0,76	0,55	0,6	0,63	FORT. POSITIVA
	WM 175	<i>Cryptococcus gattii</i>	1	0,78	0,85	0,87	POSITIVA
	WM 779	<i>Cryptococcus gattii</i>	0,5	0,55	0,55	0,53	FORT. POSITIVA

Fonte: Elaborada pela autora.