

Secretaria de Estado da Saúde
Vigilância Epidemiológica em Laboratório de Saúde Pública
Instituto Adolfo Lutz

Hugo Maistrelo Torres Lima

Cryptococcus gattii **COMO AGENTE ETIOLÓGICO DAS INFECÇÕES
HUMANAS**

Ribeirão Preto
2019

Hugo Maistrelo Torres Lima

Cryptococcus gattii **COMO AGENTE ETIOLÓGICO DAS INFECÇÕES HUMANAS**

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto Adolfo Lutz- Unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/S- Doutor Antônio Guilherme de Souza como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública.

Orientadora: Ma. Jaqueline Otero Silva

Ribeirão Preto

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Lima, Hugo Maistrolo Torres

Cryptococcus gattii como agente etiológico das infecções humanas/ Hugo Maistrolo Torres Lima– Ribeirão Preto, 2019.

41 f. il

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização-Vigilância Laboratorial em Saúde Pública)-Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, CEFOR/SUS-SP, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2019.

Área de concentração: Vigilância Epidemiológica em Laboratório de Saúde Pública

Orientação: Prof. Me. Jaqueline Otero Silva

1-Cryptococcosis; 2-Cryptococcus gattii; 3-Cryptococcal Meningitis; 4-Fungal Meningitis

SES/CEFOR/IAL-25/2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, minha namorada, amigos, professores, orientadores e todos aqueles que de alguma forma me ajudaram direta ou indiretamente a finalizar esse trabalho, todos que tiveram paciência comigo em momentos de tensão e de empenho, e que me ajudaram a conseguir chegar até aqui. Muito Obrigado!!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 — Mecanismos de penetração do <i>Cryptococcus</i> pela barreira hematoencefálica	17
Figura 2 — Estruturas leveduriformes de <i>Cryptococcus</i> observadas em microscópio óptico sob coloração de contraste com tinta nanquim.....	22
Figura 3 — Colônias de <i>Cryptococcus</i> produtoras de melanina em ágar niger.....	23
Figura 4 — Meio CGB diferenciando <i>C. gattii</i> (Azul) de <i>C. neoformans</i> (Verde).....	23

LISTA DE SIGLAS

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

BHE – Barreira Hematoencefálica

CGB – Canavanina, Glicina, Azul de Bromotimol

CIM – Concentração inibitória mínima

CLSI – Clinical & Laboratory Standards Institute

EUA – Estados Unidos da América

EUCAST – European Committee on Antimicrobial. Susceptibility Testing

GalXM – Galactoxilomanana

GXM – Glucuronoxilomanana

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IFN- γ – Interferon gama

IgG – Imunoglobulina G

PCR – Reação em cadeia da polimerase

SNC – Sistema Nervoso Central

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

RESUMO

A criptococose é uma micose sistêmica causada por fungos leveduriformes capsulados do gênero *Cryptococcus* e apresenta taxas significativas de morbidade e mortalidade. *C. neoformans* é a espécie prevalente seguida por *C. gattii*. A transmissão da criptococose ocorre pela inalação de propágulos fúngicos infecciosos no ambiente e, portanto, acomete primariamente os pulmões podendo ou não se disseminar via hematogênica para outros órgãos, especialmente o sistema nervoso central, causando meningoencefalite. Embora as duas espécies de *Cryptococcus* possam acometer humanos, ambas denotam aspectos clínicos e epidemiológicos distintos. *C. gattii* é reconhecido como patogênico, enquanto *C. neoformans* é considerado oportunista. O objetivo deste estudo foi relatar as características etiológicas, epidemiológicas, laboratoriais e a ocorrência das infecções causadas por *C. gattii*, valorizando sua importância na saúde pública. Trata-se de uma revisão bibliográfica, tendo como principais fontes: artigos, dissertações, teses e livros indexados nas bases de dados: Scientific Electronic Library Online (SCIELO), National of Medicine Institutes of Health (MEDLINE), National Center for Biotechnology Information (NCBI), U. S. National Library of Medicine (PUBMED), Biblioteca Virtual de Saúde (BVS) e Google Acadêmico utilizando como descritores: Criptococose, *Cryptococcus gattii*, Meningite Fúngica e Meningite Criptocócica. A ocorrência de *C. gattii* é endêmica nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Entretanto, tal agente fúngico, também é isolado de amostras clínicas e ambientais nas regiões Sul e Sudeste, evidenciando sua distribuição por todo o país, com predomínio do tipo molecular VGII. O eucalipto não representa mais o habitat específico do *C. gattii*, devido também o seu isolamento de solos, restos de plantas, ar e diferentes espécies de árvores. *C. gattii* é considerado patógeno primário da criptococose, causando meningoencefalite, especialmente em jovens adultos do sexo masculino e crianças imunocompetentes. Quando comparado a *C. neoformans*, as cápsulas de *C. gattii* podem apresentar-se maiores, assim como, enzimas fenoloxidase, fosfolipases, proteinases e biofilmes podem ser expressos em maior quantidade. Quanto à suscetibilidade antimicrobiana, *C. gattii* tem apresentado valores maiores de concentrações inibitórias mínimas ao fluconazol, demonstrando maior resistência a este antifúngico. Tais achados podem justificar o comportamento de agente primário da criptococose e dificuldade no

tratamento. Portanto, o profissional de saúde deve estar atento à ocorrência de infecção em pacientes imunocompetentes de faixa etária que não costuma estar associada à AIDS.

Palavras Chave: Criptococose, *Cryptococcus gattii*, Meningite Criptocócica e Meningite fúngica.

ABSTRACT

Cryptococcosis is a systemic mycosis caused by capsulated yeast of the genus *Cryptococcus* and presents significant rates of morbidity and mortality. *C. neoformans* is the prevalent species followed by *C. gattii*. The transmission of cryptococcosis occurs by the inhalation of infectious fungal propagules in the environment and, therefore, the infection is capable of affecting primarily the lungs. The infection may also or not spread hematogenously to other organs, especially the Central Nervous System, causing meningoencephalitis. Although both species of *Cryptococcus* can affect humans, both denote distinct clinical and epidemiological aspects. *C. gattii* is recognized as pathogenic, while *C. neoformans* is considered opportunistic. This study aimed to report the etiological, epidemiological, and laboratory aspects and infection occurrence caused by *C. gattii*, valuing its importance in public health. It is a bibliographical review, having as main sources: articles, dissertations, theses and books indexed in databases: Scientific Electronic Library Online (SCIELO), National Institutes of Health (MEDLINE), National Center for Biotechnology Information (NCBI), *United States National Library of Medicine* (PUBMED), Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) and Google Scholar using as descriptors: Cryptococcosis, *Cryptococcus gattii*, Cryptococcal Meningitis and Fungal Meningitis. The occurrence of *C. gattii* is endemic in the North and Northeast regions of Brazil. However, such fungal agent is also isolated from clinical and environmental samples in the South and Southeast regions, evidencing its distribution throughout the country, with predominance of the molecular type VGII. Eucalyptus no longer represents the specific habitat of *C. gattii*, due also to its isolation of soils, plant remains, air and different species of trees. *C. gattii* is considered the primary pathogen of cryptococcosis, causing meningoencephalitis, especially in young adult male and immunocompetent children. When compared to *C. neoformans*, *C. gattii* capsules may be larger, as well as, the enzymes phenoloxidase, phospholipases, proteinases and biofilms may be expressed in greater quantity. Regarding antimicrobial susceptibility, *C. gattii* has presented higher values of minimum inhibitory concentrations to fluconazole, demonstrating greater resistance to this antifungal. Such findings may justify the primary agent behavior of cryptococcosis and difficulty in treatment. Therefore, the health professional should be aware of the

occurrence of infection in immunocompetent patients of the age group that is not usually associated with AIDS.

Keywords: Cryptococcosis, *Cryptococcus gattii*, Cryptococcal Meningitis and Fungal Meningitis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVO	13
3. METODOLOGIA	13
4. REVISÃO DE LITERATURA	13
4.1 Histórico	13
4.2 Epidemiologia	14
4.3 Patogênese	16
4.4 Fatores de virulência	18
4.4.1 Cápsula	18
4.4.2 Melanina	19
4.4.3 Desenvolvimento a 37°C	19
4.4.4 Síntese de urease	20
4.4.5 Produção de Exoenzimas	20
4.4.6 Produção de Biofilme	21
4.5 Diagnóstico Laboratorial	21
4.5.1 Exame direto	21
4.5.2 Cultura e identificação	22
4.5.3 Diferenciação das espécies <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i>	23
4.5.4 Testes de susceptibilidade aos antifúngicos	23
4.5.5 Biologia Molecular	24
4.5.6 Sorologia	25
4.6 Tratamento	25
4.7 Resistência aos antifúngicos azólicos	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	27
6. CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1. INTRODUÇÃO

A criptococose é uma micose sistêmica causada por fungos leveduriformes capsulados do gênero *Cryptococcus*, principalmente pelas espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, sendo de ampla distribuição e significativa morbidade e mortalidade (PERFECT et al., 2010).

O principal componente polissacarídico da cápsula, a glucuronoxilomanana (GXM), classifica *Cryptococcus* em cinco sorotipos (A, B, C, D e AD), sendo que *C. gattii* corresponde aos sorotipos B e C, e *C. neoformans* corresponde aos sorotipos A, D e AD (KON et al., 2008).

Através da biologia molecular, essas espécies foram divididas em oito genótipos por apresentarem características gênicas distintas, sendo quatro genótipos para cada espécie: *C. neoformans* - VNI, VNII, VNIII e VNIV e *C. gattii* - VGI, VGII, VGIII e VGIV (MEYER et al., 1999).

De acordo com Casali et al., (2003) esses agentes causam infecções em imunocompetentes, contudo, os indivíduos afetados em maior parte, são imunodeprimidos, principalmente portadores do HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana). Previamente ao surgimento da infecção pelo vírus HIV, a criptococose era relacionada a outras causas de imunodepressão, como: neoplasias, diabetes mellitus, hepatopatias, nefropatias e uso contínuo de alguns medicamentos. Após o significativo aumento dos casos de HIV na década de 80 viu-se uma íntima relação entre a criptococose e a AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), uma vez que o comprometimento da imunidade celular viabiliza a ocorrência de infecções oportunistas (LACAZ et al., 2002; MOREIRA et al., 2006).

Embora essas espécies de *Cryptococcus* possam ser patógenas ao homem, ambas denotam aspectos clínicos e epidemiológicos distintos: *C. neoformans* é encontrado no solo e em excretas de aves. Distribuído amplamente no mundo, tem caráter oportunista e está relacionado com a imunossupressão celular, em especial com indivíduos HIV soropositivo. Ao passo que o *C. gattii* é endêmico em áreas tropicais e subtropicais, sendo relatado em diferentes espécies de árvores e tem predisposição a infectar indivíduos com funções imunológicas integras (FILIÚ et al., 2002; SRIKANTA; SANTIAGO-TIRADO; DOERING, 2015). O acesso ao hospedeiro ocorre pela inalação de propágulos fúngicos infectantes no ambiente. Dessa forma, a infecção é capaz de acometer primariamente os pulmões, podendo ou não

espalhar-se por via hematogênica para outros órgãos, dos quais são relatados: pele, fígado, rins, linfonodos periféricos e sistema nervoso central (SNC), onde esses fungos exibem tropismo podendo ocasionar quadros de meningoencefalite (GAO et al., 2017). A instalação do quadro clínico e a disseminação da doença estão estreitamente ligadas com a imunidade do hospedeiro, a virulência da cepa e carga fúngica inalada (BICANIC; HARRISON, 2004).

A habilidade desses agentes em promover a infecção está relacionada com a expressão de fatores de virulência, como cápsula polissacarídica, produção de melanina, capacidade de desenvolver-se a 37°C, síntese e secreção de urease, proteases, fosfolipases e produção de biofilme. Estes fatores favorecem a sobrevivência dos microrganismos criando mecanismos de fuga e agressão às defesas do hospedeiro permitindo a invasão de tecidos, utilização de fontes nutricionais e consequente desenvolvimento da patogenia (SABIITI; MAY, 2012).

O diagnóstico da criptococose é, particularmente, clínico e laboratorial, sendo a maior parte dos casos diagnosticada como meningoencefalite. Os sinais e sintomas mais comuns são: dor de cabeça, febre, rigidez de nuca, alterações visuais e comportamentais (DARZÉ et al., 2000; SAAG et al., 2000). Quanto ao diagnóstico laboratorial, o exame direto com tinta nanquim e a cultura em ágar sabouraud com cloranfenicol são os métodos mais utilizados (AMARO, 2006; KON et al., 2008).

Os fármacos mais empregados na terapêutica são a anfotericina B e suas apresentações farmacotécnicas, 5-flucitosina e os antifúngicos triazólicos, dos quais os mais usados são o fluconazol e o itraconazol (KON et al., 2008).

Com o uso frequente e prolongado dos antifúngicos triazólicos no tratamento das infecções fúngicas, pode-se notar o surgimento de falhas terapêuticas, recidiva da doença e aparecimento de cepas resistentes (GRAYBILL et al., 1998). Pappalardo e Melhem (2003) alertaram sobre o risco do aparecimento de isolados de *Cryptococcus* sp. resistentes aos derivados triazólicos.

Dado a gravidade da criptococose e a emergência de *C. gattii* como agente etiológico das meningites fúngicas em pacientes imunocompetentes, a proposta deste trabalho é de enfatizar sua importância na saúde pública atendendo a meta do Plano Estadual de Saúde de aprimorar a detecção e resposta às emergências em saúde pública além de fortalecer e aprimorar a estrutura das sub-redes de Laboratórios de Saúde Pública do Instituto Adolfo Lutz.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Ressaltar a importância da vigilância de *C. gattii* para saúde pública.

2.2. Objetivos específicos

Relatar as características etiológicas, epidemiológicas, laboratoriais e a ocorrência das infecções causadas por *C. gattii*.

3. METODOLOGIA

O presente trabalho consiste em uma revisão bibliográfica, tendo como principais fontes: artigos, dissertações, teses e livros indexados nos seguintes bancos de dados: Scientific Electronic Library Online (SCIELO), National of Medicine Institutes of Health (MEDLINE), National Center for Biotechnology Information (NCBI), U. S. National Library of Medicine (PUBMED), Biblioteca Virtual de Saúde (BVS) e Google Acadêmico. Para realizar a busca das fontes literárias foram usados os descritores: Cryptococcosis, *Cryptococcus gattii*, Fungal Meningitis e Cryptococcal Meningitis.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Histórico

O primeiro relato de criptococose humana ocorreu em 1894 sendo descrito pelos pesquisadores alemães, Otto Busse e Abrham Buschlke ao isolarem um fungo de lesão tibial de uma paciente. Os pesquisadores cultivaram o microrganismo e o nomearam como *Saccharomyces hominis* (KNOKE; SCHWESINGER, 1994).

Nesse mesmo período, na Itália, Sanfelice isolou leveduras capsuladas de suco de pêssago e demonstrou seu potencial patogênico em animais de laboratório, sendo nomeadas de *Saccharomyces neoformans* (BARNETT, 2010).

Em 1901 a classificação desses isolados em *Saccharomyces* foi questionada por Vuillemin, pois os mesmos não produziam ascósporos e não fermentavam fontes de carbono. Vuillemin propôs então, a reclassificação para o gênero *Cryptococcus*, sendo as espécies *C. hominis* e *C. neoformans* (ESPINEL-INGROFF; KIDD, 2015).

Von Hansemann, em 1905, relatou a presença do fungo na meninge de paciente morta e Verse, em 1994, diagnosticou o primeiro caso de meningite causada por *Cryptococcus* em paciente viva (BARBOZA, 2011). Stoddard e Cutler,

após alguns anos, descreveram dois quadros de meningite em humanos causados por fungos e nomearam o agente como *Torula histolytica* (FRANÇA, 2015).

Benham em 1935, analisando diversas cepas até então caracterizadas como *Saccharomyces*, *Cryptococcus* e *Torula*, propôs o agrupamento destes agentes no gênero *Cryptococcus*, levando em consideração a morfologia, reatividade a fatores séricos e patogenicidade de cada cepa. Alguns anos mais tarde a mesma pesquisadora sugeriu que a doença fosse renomeada para criptococose e que seu agente fosse designado de *Cryptococcus neoformans* (FRANÇA, 2015).

Emmons em 1955 relatou um importante estudo que estabeleceu a fonte de infecção da doença verificando a presença do *C. neoformans* em excretas de aves e ambientes contaminados com fezes, especialmente de pombos (MACHADO, 2015).

Gatti e Eeckels (1970), em um caso de meningoencefalite em criança isolaram uma cepa de *C. neoformans* com morfologia atípica, apresentando forma alongada diferente das outras cepas comumente isoladas da época. Ainda em 1970, Vanbreuseghem e Takashio, analisaram a mesma cepa e confirmaram que “in vivo” demonstrava-se com característica alongada e em cultura permanecia com a morfologia arredondada ou oval típica de *C. neoformans*, propondo então, a classificação de uma nova variedade chamada de *C. neoformans var. gattii* (VANBREUSEGHEM; TAKASHIO, 1970). Kwon-chung, Bennett e Theodore (1978) verificaram diferenças morfológicas, bioquímicas e sorológicas entre de *C. var. neoformans* e *C. var. gattii* sugerindo então, a mudança da denominação *C. bacillisporus* para *C. neoformans var. gattii*. Em 2002, devido à acentuada utilização da nomenclatura *gattii* pelo mundo foi decidido renomear o fungo para *C. gattii* (KWON-CHUNG et al., 2002).

No Brasil, os primeiros relatos da doença foram datados em 1941 e 1944, ambos estudados por Lacaz e Almeida, respectivamente (PAPPALARDO; MELHEM, 2003). A nomenclatura e os conhecimentos do gênero alteraram-se com o passar do tempo e até hoje são estudados. Atualmente, a biologia molecular vem sendo empregada como recurso para o entendimento e diferenciação genotípica das espécies contribuindo para estudos-epidemiológicos (BONFIETTI et al., 2014).

4.2 Epidemiologia

A criptococose é uma micose sistêmica, cosmopolita, causada principalmente pelo *C. neoformans* e *C. gattii*, atinge em sua maioria a faixa etária dos 30 aos 59

anos e apresenta-se mais prevalente no sexo masculino (MEZZARI et al., 2013).

Apesar de estas espécies promoverem doença no homem, ambas denotam aspectos clínicos e epidemiológicos distintos. *C. neoformans* é amplamente distribuído no mundo, tem correlação com a imunossupressão celular e é frequentemente isolado em solos, poeira domiciliar, ambientes contaminados com fezes de pombos e de outras aves (FILIÚ et al., 2002). O desenvolvimento do *Cryptococcus* sp. nas fezes das aves ocorre pela utilização da ureia e creatina, compostos esses que são metabolizados e usados pelos fungos como importantes fontes de nitrogênio para sua sobrevivência (KON et al., 2008).

C. gattii é um patógeno primário que acomete, geralmente, indivíduos imunocompetentes, sendo associado a regiões tropicais e subtropicais e foi isolado ambientalmente à primeira vez na Austrália em árvores do gênero *Eucalyptus*, mais especificamente *Eucalyptus camaldulensis*, onde foi considerado, primeiramente, seu habitat natural e específico (ELLIS; PFEIFFER, 1990). No entanto sabe-se atualmente, que *C. gattii* possui diferentes padrões geográficos de ocorrência sendo isolado de solos, restos vegetais, ar e diferentes espécies de árvores e com isso eucaliptos não mais representam habitat e nem associação específica com esse agente (KIDD et al., 2004; KON et al., 2008).

Segundo Cogliati (2013), *C. gattii* pode ser considerado um patógeno cosmopolita, por estar associado a madeira deteriorada, restos vegetais, poeira e solo, apresentando certa similaridade aos nichos ecológicos de *C. neoformans*. Em seu trabalho realizou uma análise da distribuição geográfica mundial dos diferentes genótipos de *Cryptococcus* sp. em países da Oceania, América do Norte, América do Sul e Central, Europa, África e do Sudeste Asiático, evidenciando o surgimento de *C. gattii* em todos eles. Contudo, apenas os continentes: Oceania, América e o Sudeste Asiático revelaram taxas mais expressivas de *C. gattii*.

Dentre as regiões do mundo analisadas, a América Central e a do Sul comportaram-se como importantes focos de criptococose, contribuindo com 10.548 isolados ficando atrás somente da Ásia (19.651) e África (19.647). Desses 10548 isolados, o Brasil colaborou com 53% (5.709) sendo o quarto país com maior número de isolados, seguido por 22% da Colômbia e 15% da Argentina. Os genótipos predominantes encontrados no Brasil foram o VNI e VGII, sendo os demais tipos moleculares identificados em menor proporção.

As regiões Sul e Sudeste do Brasil expressam significativa prevalência da criptococose associada a AIDS, causada por *C. neoformans* demonstrando predomínio no sexo masculino, da faixa etária de 30 a 39 anos e exibindo uma letalidade em torno de 35 a 40% enquanto que as infecções por *C. gattii* são casuais. Nas regiões Norte e Nordeste a ocorrência de *C. gattii* é endêmica e age como patógeno primário, apresentando altas taxas de morbidade e letalidade (37 a 49%), podendo causar quadros de meningoencefalite em adultos e crianças, sem distinção quanto ao sexo (BRASIL, 2012).

No Brasil, o tipo gênico de maior expressão é o VNI, seguido de VGII e VNII. Estratificando por macrorregião, temos a macrorregião Norte-Nordeste onde o *C. gattii* (VGII) é endêmico e comumente isolado tanto em fontes ambientais quanto em amostras clínicas. Ao passo que, o *C. neoformans* (VNI) mostra-se mais relacionado a isolados clínico-ambientais nas regiões Sul-Suldeste, essa característica pode estar associada ao maior número de pacientes imunodeprimidos nessas áreas, principalmente HIV positivos (TRILLES et al., 2008).

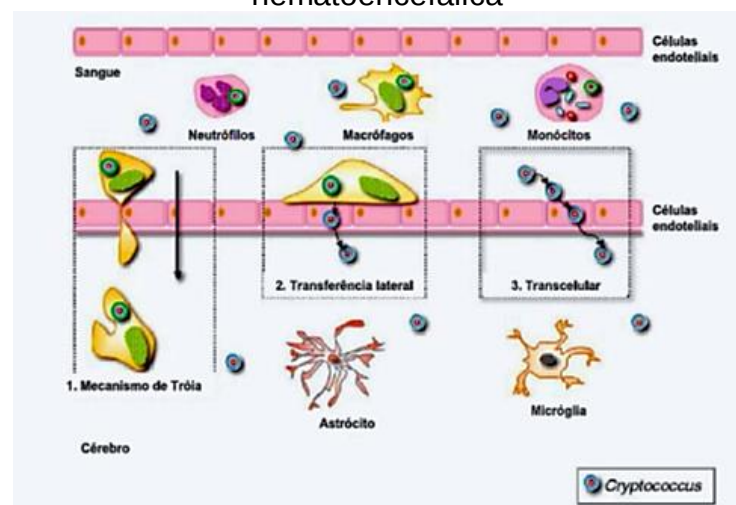
4.3 Patogênese

A infecção do hospedeiro ocorre pela inalação de propágulos fúngicos infectantes presentes no meio ambiente. As partículas ao serem aspiradas depositam-se em partes mais profundas do trato respiratório (SABIITI; MAY, 2012). Ao chegarem aos alvéolos, às leveduras entram em contato com os macrófagos residentes, os quais realizam o processo de fagocitose induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias que estimulam o recrutamento de mais macrófagos para o combate do fungo. Neste contexto, o sistema imune do hospedeiro induz uma resposta inflamatória do tipo Th1 que pode seguir uma de três vias possíveis. A primeira, não ocorre surgimento da enfermidade devido a uma resposta imunológica adequada do hospedeiro, conseguindo assim, eliminar a carga fúngica. A segunda via ocorre através de uma infecção assintomática, devido o estado de latência do fungo que apresenta-se “adormecido” no hospedeiro esperando condições favoráveis de imunossupressão para reativar-se e desenvolver a doença no indivíduo. A terceira via ocorre em pacientes imunocomprometidos, o fungo se desenvolve e ocasiona doença no sítio primário de infecção podendo disseminar-se por via hematogênica para diversos órgãos, incluindo o SNC (SABIITI; MAY, 2012).

Portanto, os macrófagos alveolares são a primeira barreira celular de defesa do hospedeiro. A resposta inflamatória do tipo Th1 pode induzir a formação de granulomas pulmonares tendo um papel importante na contenção da disseminação da doença para outros órgãos (FRANÇA, 2015). A instalação do quadro clínico e disseminação da doença estão estreitamente ligadas à imunidade do hospedeiro, virulência da cepa e carga fúngica inalada (BICANIC; HARRISON, 2004).

São relatados três possíveis mecanismos de disseminação do *Cryptococcus*, dos quais o fungo circula por via hematogênica e penetra a barreira hematoencefálica (BHE) atingindo o SNC e ocasionando quadros de meningoencefalite. O primeiro mecanismo ocorre quando o *Cryptococcus* sp. sofre o processo de fagocitose por macrófagos e outros fagócitos, contudo, estas leveduras sobrevivem e desenvolvem-se dentro dos fagócitos. Dessa forma, os fungos permanecem no interior dessas células e são transportados via circulação sanguínea até a BHE penetrando-a e alcançando o SNC dentro dos fagócitos. Durante todo esse trajeto os fungos mantêm-se protegidos dos ataques do sistema imunológico pelas células fagocíticas, sendo esse mecanismo denominado de “Cavalo de Tróia”. O segundo mecanismo consiste na internalização do *Cryptococcus* pelas células endoteliais dos capilares sanguíneos do SNC através de um processo de transcitose, ou seja, os fagócitos infectados deslocam-se até os capilares da BHE onde ocorrerá a transferência lateral das leveduras para células endoteliais que as captam (Figura 1).

Figura 1 — Mecanismos de penetração do *Cryptococcus* pela barreira hematoencefálica



Fonte: Adaptado de (MA; MAY, 2009)

Numa etapa seguinte, as células fúngicas migram e atravessam o citoplasma celular sem causar dano ao endotélio vascular, atingindo o tecido cerebral (FRANÇA, 2015; KRONSTAD et al., 2011). No terceiro mecanismo, chamado de paracelular, as leveduras isoladas atravessam os espaços intracelulares das células endoteliais dos capilares da BHE, no entanto, esse fenômeno enfraquece e causa danos às junções comunicantes do endotélio vascular, resultando em processo inflamatório e danos a BHE (SABIITI; MAY, 2012).

4.4 Fatores de virulência

Os fatores de virulência tem como finalidade a invasão tecidual, utilização de fontes nutricionais, fuga e agressão das defesas imunológicas e consequente desenvolvimento da patogenia (SABIITI; MAY, 2012).

4.4.1 Cápsula

A cápsula de *Cryptococcus* sp. é composta em grande parte por duas moléculas polissacarídicas e uma pequena parcela de manoproteínas. As frações polissacarídicas são representadas pela glucuronoxilomanana (GXM) em torno de 90 a 95% e a galactoxilomanana (GalXM) entre 5 a 8%, as manoproteínas constituem em média 1% da composição total da cápsula. Os sorotipos A, B, C, D e AD do *Cryptococcus* são determinados pelas características estruturais do polissacarídeo GXM (ZARAGOZA et al., 2010). Esta conformação capsular confere a levedura proteção contra o estresse oxidativo produzido no interior dos macrófagos durante o processo de fagocitose, inibição da fixação do sistema complemento e bloqueio da ligação de opsoninas e imunoglobulina G (IgG) à superfície do fungo. Todos estes fatores convergem para uma redução do processo fagocitário (GATES; THORKILDSON; KOZEL, 2004; ZARAGOZA et al., 2010). Zaragoza et al., (2010) descrevem que cepas encapsuladas ou altamente encapsuladas expressam maior virulência quando comparadas a cepas acapsuladas ou hipocapsuladas devido à redução da fagocitose realizada pelos macrófagos. Nesse contexto, o comprometimento da apresentação de antígenos pelos macrófagos, seguido da diminuição da proliferação e atividade das células T, acarreta em uma resposta imunológica inadequada.

Diante disto, a cápsula polissacarídica desempenha papel importante como fator de virulência, visto que essa estrutura exhibe caráter antifagocitário e imunomodulador do sistema imune do hospedeiro (ZARAGOZA et al., 2010).

4.4.2 Melanina

A melanina é uma macromolécula hidrofóbica de alto peso molecular com diversas funções na patogênese do *Cryptococcus*. A propriedade antioxidante desse pigmento favorece a proteção do fungo frente o estresse oxidativo causado pelas células fagocíticas do sistema imunológico. Entre outras funções, tem-se a resistência à atividade fungicida dos raios ultravioleta, proteção contra variações de temperatura e maior proteção contra a ação farmacológica da anfotericina B e da caspofungina (BARBOZA, 2011; FRANÇA, 2015).

Tanto *C. gattii* quanto *C. neoformans* sintetizam o pigmento através de reações enzimáticas frente às substâncias fenólicas como: L-DOPA, dopamina, epinefrina e norepinefrina. Essas reações são catalizadas por uma enzima chamada fenoloxidase, do tipo lacase que apresenta como co-fatores para seu funcionamento os íons cobre e ferro. Frente a isto, o notável tropismo pelo SNC adquirido por esses fungos pode ser evidenciado, dado que, muitos desses compostos fenólicos são neurotransmissores e aparecem em concentrações maiores no tecido nervoso (BARBOZA, 2011; FRANÇA, 2015).

4.4.3 Desenvolvimento a 37°C

A habilidade em desenvolver-se a 37°C, temperatura corporal humana, é uma condição essencial para que patógenos possam exercer a infecção no hospedeiro. De maneira geral, *Cryptococcus* sp., podem crescer entre 25°C a 37°C, enquanto *C. gattii* mostra-se mais sensível a temperaturas elevadas, crescendo melhor na temperatura de 30°C (KON et al., 2008).

Genes ligados ao desenvolvimento dessas leveduras a 37°C foram identificados através de estudos moleculares (PERFECT, 2006). O gene CNA-1 é responsável por codificar a calcineurina A, uma proteína fosfatase com atividade serina/treonina específica relacionada com a resposta de estresse do microrganismo e apresenta importância no crescimento do fungo a 37°C (CRUZ; FOX; HEITMAN, 2001; ODOM et al., 1997).

Odom et al., (1997) demonstraram que cepas de *Cryptococcus* mutantes para o gene CNA-1 cresciam em temperatura de 24°C, mas não se desenvolviam a 37°C “in vitro”. Ao testarem estas cepas mutantes em coelhos imunossuprimidos observaram que as mesmas não eram patogênicas aos animais, ou seja, as cepas se tornaram menos virulentas. Deste modo, a expressão de calcineurina A mostra-se necessária para a virulência do fungo, sobrevivência frente a temperaturas mais

elevadas e no desenvolvimento de sua patogenia (CRUZ; FOX; HEITMAN, 2001; ODOM et al., 1997).

4.4.4 Síntese de urease

A urease é uma enzima que constitui um importante fator de virulência do *C. gattii* e *C. neoformans* e é codificada pelo gene URE 1. Esta enzima tem como função catalisar a hidrólise da ureia produzindo carbamato e amônia como produtos finais da reação. Dessa maneira, a reação enzimática propicia maior viabilidade de fontes de nitrogênio e consequente aumento do pH local pelos produtos formados (COX et al., 2000; OLSZEWSKI et al., 2004).

Cox et al., (2000) ao introduzirem em camundongos cepas de *Cryptococcus* que sofreram deleção do gene URE 1, notaram que essas cepas denotavam menor virulência quando comparadas com cepas URE 1 positivas, produtoras de urease. Sugerindo a relevância da urease na patogênese desses fungos.

Presume-se que além da atividade de hidrólise da ureia, essa enzima possa estar relacionada ao mecanismo de patogênese e invasão dessas leveduras para o SNC (OLSZEWSKI et al., 2004).

Shi et al., (2010) evidenciaram a interação da enzima urease no processo de transmigração desses fungos para o SNC. Os pesquisadores compararam duas cepas distintas de *Cryptococcus*, sendo que a primeira cepa era inativada para o gene URE 1 e a outra cepa selvagem (H99), produtora de urease. Em análise final, os autores notaram que as cepas produtoras de urease haviam transmigrado para o tecido cerebral do camundongo em maior intensidade do que as cepas negativas para o gene URE 1. Dessa forma, os pesquisadores sugerem a participação da urease no processo de invasão e patogênese dessas leveduras.

4.4.5 Produção de Exoenzimas

As proteases e fosfolipases produzidas por *C. gattii* e *C. neoformans* são consideradas fatores de virulência essenciais para promoção da infecção, por serem capazes de degradar as membranas celulares e causarem danos às células hospedeiras, possibilitando assim à invasão tecidual e desenvolvimento da criptococose. As proteases são capazes de degradar proteínas estruturais dos tecidos do hospedeiro, como: elastina, colágeno e fibrinogênio e as proteínas imunológicas, como as imunoglobulinas e fatores do sistema complemento. As fosfolipases exercem atividade enzimática na desestruturação das membranas

celulares, causando lise e danificando a integridade da célula hospedeira favorecendo a invasão e disseminação do *Cryptococcus* no sangue, pulmão e em outros órgãos, inclusive no SNC. A associação das proteinases e fosfolipases colaboram no processo de replicação do *Cryptococcus* dentro dos macrófagos do hospedeiro causando lesões nas membranas fagossômicas dos macrófagos, assim impedindo que os fungos sejam mortos pela ação enzimática desses fagócitos (SABIITI; MAY, 2012).

4.4.6 Produção de Biofilme

O biofilme caracteriza-se como um fator de virulência presente em bactérias e fungos e é formado pelo agrupamento de microrganismos, promovendo o desenvolvimento de comunidades que ficam aderidas a tecidos ou estruturas abióticas, principalmente cateteres e outros dispositivos médicos (JESUS, 2013).

A constituição do biofilme produzido pelo *Cryptococcus* está relacionada com o polissacarídeo capsular glucoroxilomanana (GXM) e alguns carboidratos, como: glicose, ribose e fucose. O fungo utiliza-se dessas moléculas para produzir uma espécie de matriz polimérica composta desses sacarídeos que mantém as células fúngicas agregadas entre si (PESSOA; SILVA; GOMES, 2012).

Neste contexto, o biofilme propicia mecanismos de proteção contra a ação e difusão de antimicrobianos nos tecidos e também dificulta a ação do sistema imunológico. Entre outras funções, auxilia na adesão e colonização do patógeno frente o hospedeiro (JESUS, 2013).

A ocorrência de biofilme criptococcico “in vivo” já foi relatada na literatura e, geralmente, está associada a superfícies de aderência, como: cateteres e outros dispositivos cirúrgicos (MARTINEZ; CASADEVALL, 2015; WALSH et al., 1986).

4.5 Diagnóstico Laboratorial

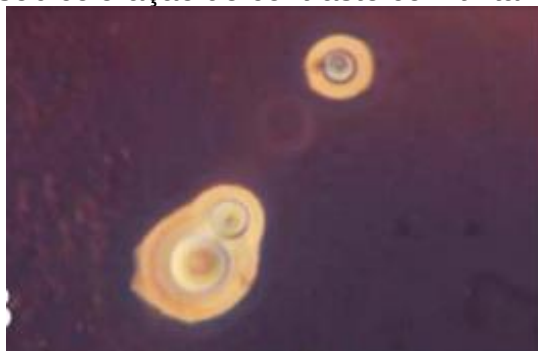
O diagnóstico laboratorial da criptococose pode ser realizado a partir de diversas amostras clínicas como: líquido, escarro, aspirados e raspados de lesões cutâneas, urina, entre outras, dependendo do tipo de infecção. (MENDES, 2009; PEDROSO; CANDIDO, 2006).

4.5.1 Exame direto

O exame direto consiste na coloração de contraste utilizando tinta nanquim sobre a amostra biológica e posterior observação em microscópio óptico (400x) de estruturas leveduriformes com halos claros ao seu redor, representativos da cápsula

polissacarídica (Figura 2). A sensibilidade desse método para indivíduos portadores da AIDS é de cerca de 80% e para não portadores da AIDS aproximadamente 50% (AMARO, 2006; KON et al., 2008).

Figura 2 — Estruturas leveduriformes de *Cryptococcus* observadas em microscópio óptico sob coloração de contraste com tinta nanquim



Fonte: Adaptado de (KON et al., 2008)

4.5.2 Cultura e identificação

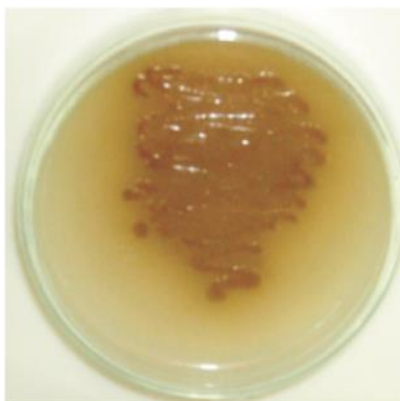
O cultivo é realizado entre 25°C a 37°C e é considerado padrão-ouro para o diagnóstico da enfermidade (KON et al., 2008; MENDES, 2009). Podem ser usados meios de cultura como ágar sangue, ágar infusão cérebro-coração, sendo o ágar sabouraud é o mais indicado (AMARO, 2006; KON et al., 2008; MENDES, 2009).

A adição de antimicrobianos como cloranfenicol, pode facilitar o isolamento uma vez que impede o desenvolvimento de outros microrganismos, no entanto, a cicloheximida não é indicada, pois inviabiliza o crescimento de *Cryptococcus sp.* (AMARO, 2006; KON et al., 2008). Em ágar Sabouraud dextrose a levedura forma colônias brilhantes, viscosas e úmidas de tonalidade de branco a creme a partir de 72 horas de incubação (AMARO, 2006; PEDROSO; CANDIDO, 2006).

As espécies de *Cryptococcus* são identificadas pelas provas de produção da urease, assimilação de fontes de carbono e nitrogênio e incapacidade fermentativa (AMARO, 2006; BALTAZAR; RIBEIRO, 2008).

Meios que possuem compostos fenólicos em seu conteúdo, como: ágar niger (extrato de *G. abyssinica*), ágar semente de girassol, ágar dopamina, ágar L-dopa podem ser utilizados tanto no primo isolamento como meio seletivo e diferencial, como para avaliar a produção de melanina sintetizada pela fenoloxidase, produzida por *C. neoformans* e *C. gattii*. Deste modo, a formação do pigmento resulta em colônias de coloração amarronzada característica destas espécies (Figura 3) (AMARO, 2006; PEDROSO; CANDIDO, 2006).

Figura 3 — Colônias de *Cryptococcus* produtoras de melanina em ágar niger

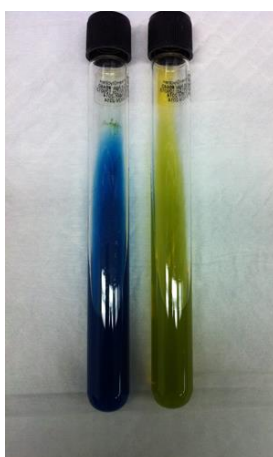


Fonte: Adaptado de (GOMES et al., 2010)

4.5.3 Diferenciação das espécies *C. gattii* e *C. neoformans*

Na determinação das duas principais espécies, geralmente utiliza-se o ágar canavanina, glicina, azul de bromotimol (CGB); em 1 a 5 dias, somente isolados de *C. gattii* mostram-se resistentes a canavanina e detém a capacidade de metabolizar o aminoácido glicina como fonte de carbono e nitrogênio, resultando na liberação de amônia e alcalinização do meio. O aumento do pH induz a viragem do indicador azul de bromotimol alterando a cor do meio de verde para azul. *C. neoformans* tem seu crescimento inibido pela canavanina e dessa forma, o meio CGB permanece com a coloração inicial (Figura 4) (AMARO, 2006; MENDES, 2009).

Figura 4 — Meio CGB diferenciando *C. gattii* (Azul) de *C. neoformans* (Verde)



Fonte: Adaptado de (CDC, 2015)

4.5.4 Testes de susceptibilidade aos antifúngicos

Com o aumento das infecções fúngicas e o surgimento de casos de resistência aos antifúngicos disponíveis, viu-se a necessidade da implantação e padronização de testes de sensibilidade “in vitro” para esses agentes.

O estabelecimento da susceptibilidade aos antifúngicos pode ser realizado pelas técnicas de diluição em caldo ou ágar, sendo que as técnicas de diluição em caldo compõem as macrodiluições em tubo e microdiluições em placas. Já as diluições em ágar (E-test) consistem na exposição do patógeno a uma fita embebida com gradiente de concentrações variáveis de antimicrobiano. Ambas as técnicas expõem o agente etiológico a concentrações variáveis de antimicrobianos, sendo que a menor concentração do fármaco que inibe o crescimento do microrganismo é chamada de concentração inibitória mínima (CIM) (ALVES et al., 2008; PAPPALARDO; MELHEM, 2003).

Nesse contexto, órgãos como o Clinical and Laboratory Standart Institute (CLSI) e European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) desenvolvem métodos de padronização para os testes de susceptibilidade aos antifúngicos (BARBOZA, 2011). Segundo o CLSI (2008) e o EUCAST (2015), os protocolos M27-S3 (CLSI) e EUCAST E.DEF 7.3 apresentam métodos de referência para determinar a CIM dos antifúngicos em técnicas de microdiluição em caldo, a fim de determinar os pontos de corte dos agentes antifúngicos mais utilizados e auxiliar na concordância interlaboratorial no estabelecimento da susceptibilidade de espécies de leveduras de *Candida* sp. e *Cryptococcus neoformans* (CLSI, 2008; EUCAST, 2015). Ambos os métodos são semelhantes e apresentam valores de CIM correspondentes, entretanto, algumas particularidades quanto ao meio de cultura, inóculo e temperatura de incubação são existentes entre os métodos (ALVES, 2017). Estudos relatam que os isolados de *Cryptococcus* mostraram ser, de maneira geral, sensíveis a anfotericina B, 5-flucitosina, fluconazol, itraconazol, posoconazol e voriconazol (CUENCA-ESTRELLA et al., 2010; ESPINEL-INGROFF et al., 2012).

Espinél-Ingroff et al., (2012), relataram sucesso terapêutico ao fluconazol de *C. neoformans*, quanto a CIM estava em 4 a 8 µg/mL e erro terapêutico quando a CIM estava acima de 16 µg/mL. No entanto, para o *Cryptococcus*, o CLSI ainda não determinou os pontos de corte da CIM para esses antifúngicos o que ressalta a necessidade de mais estudos para determinação dos pontos de corte da CIM e a relação da CIM “in vitro” com o tratamento clínico “in vivo” (ALVES, 2017).

4.5.5 Biologia Molecular

Os exames por biologia molecular apresentam altas taxas de sensibilidade e especificidade, visto que o alvo da análise é o material genético dos fungos. A

técnica mais empregada é a PCR (reação da polimerase em cadeia) a qual visa a amplificação de fragmentos específicos do DNA fúngico, possibilitando assim um diagnóstico seguro e eficaz. Entretanto, esta técnica demanda alto custo e por isso não é empregada frequentemente na rotina laboratorial (FRANÇA, 2015).

A biologia molecular é utilizada como ferramenta para o estudo e classificação molecular desses agentes. *C. gattii* e *C. neoformans* apresentam 4 tipo moleculares para cada espécie, sendo *C. gattii* distribuído em VGI, VGII, VGIII e VGIV e *C. neoformans* VNI, VNII, VNIII, VNI. A identificação molecular auxilia no entendimento das características de cada genótipo, bem como na epidemiologia molecular desses fungos, propiciando assim, compreender a relação de cada tipo molecular com sua virulência, distribuição geográfica e perfil de resistência (BONFIETTI et al., 2014).

4.5.6 Sorologia

Os testes imunológicos apresentam altas taxas de sensibilidade e especificidade, contudo, requerem maior infraestrutura e recursos laboratoriais (LINDSLEY et al., 2011). Dentre os mais utilizados estão os testes de aglutinação em látex e ELISA para pesquisa dos antígenos capsulares do agente (BICANIC; HARRISON, 2004).

4.6 Tratamento

O tratamento da criptococose é dividido em três etapas fundamentais, indução, consolidação e manutenção. Cada uma dessas etapas demonstra aspectos terapêuticos distintos e importantes para o controle da doença. A etapa de indução ocorre por no mínimo duas semanas e tem como objetivo a diminuição ou eliminação da carga fúngica infectante. A fase de consolidação consiste na tentativa de manter a carga fúngica estável e regularizar as condições clínicas e laboratoriais do paciente, e por fim a etapa de manutenção com o objetivo de impedir a recidiva da enfermidade, sendo aplicada em período de no mínimo um ano dependendo das características imunológicas do indivíduo. Dentre os fármacos utilizados no tratamento estão a anfotericina B e suas apresentações farmacotécnicas, 5-flucitosina e os antifúngicos triazólicos sendo os mais usados o fluconazol e o itraconazol (KON et al., 2008).

A anfotericina B é um fármaco da classe dos polienos e seu mecanismo de ação decorre da interação com o ergosterol na membrana celular fúngica. Desse

modo, formam-se poros nas membranas celulares dos fungos, aumentando a permeabilidade celular e resultando em saída de íons potássio, amônio, fosfato, água, carboidratos e proteínas levando a célula fúngica à depleção metabólica e consequente morte celular (FRANÇA, 2015).

A 5-flucitosina é um análogo de pirimidina e seu mecanismo de ação consiste na ligação do fármaco ao RNA fúngico tornando-o defeituoso e prejudicando a síntese de ácidos nucleicos (FRANÇA, 2015). Esse fármaco é utilizado no tratamento da criptococose, entretanto, não é acessível no Brasil (SEVERO; GAZZONI; SEVERO, 2009).

Os derivados triazólicos agem no citocromo P-450, inibindo a enzima fúngica lanosterol 14 alfa-desmetilase que é codificada pelo gene ERG11. Essa enzima realiza papel fundamental na síntese do ergosterol, componente importante da membrana plasmática dos fungos (ALVES, 2017).

4.7 Resistência aos antifúngicos azólicos

As infecções fúngicas têm ocorrido com mais frequência nas últimas décadas, devido a vários fatores, sendo os principais: o aumento de indivíduos em estado de imunossupressão, incluindo portadores do HIV, neoplasias, transplantados e uso prologando de antibióticos e corticoides. Nesse contexto, viu-se a necessidade da utilização mais ativa de antifúngicos, levando ao desenvolvimento de cepas fúngicas resistentes a essas drogas (PEREA; PATTERSON, 2002). Os mecanismos de resistência aos antifúngicos azólicos são os mais descritos na literatura e incluem a expressão de bombas de efluxo para múltiplas drogas, mutação do gene ERG11 e a heterorresistência (SIONOV et al., 2009).

A expressão de bombas de efluxo por *Cryptococcus sp.* está relacionada com o gene CnAFR1 (AntiFungal Resistance 1). Este mecanismo é mediado pela capacidade do fungo em expressar proteínas transportadoras do tipo ABC que auxiliam na expulsão de antifúngicos do meio intracelular para o meio extracelular, diminuindo o acúmulo do fármaco dentro da célula fúngica (MENDES, 2009).

A mutação do gene ERG11 induz uma alteração na estrutura protéica da enzima 14 - lanosterol alfa-desmetilase, substituindo um aminoácido glicina por serina na região G484S da enzima. Dessa forma, o sítio alvo dos azóis acaba sofrendo alteração estrutural e perdendo afinidade química com os antifúngicos e

por consequência a cepa desenvolve resistência secundária aos ázois (RODERO et al., 2003).

A heterorresistência consiste em cepas heterogêneas que apresentam subpopulações celulares distintas, podendo coexistir subpopulações susceptíveis aos antifúngicos azólicos e outras subpopulações de células resistentes aos azóis. Nesse sentido, em uma mesma cepa podem existir diferentes subpopulações fúngicas com características de resistência distintas. Subpopulações resistentes podem se adaptar gradativamente quando expostas a concentrações maiores de ázois, mas retornam ao seu limiar de susceptibilidade quando a exposição é cessada (SIONOV et al., 2009).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O consenso em criptococose (2008) definiu a criptococose como uma micose sistêmica classificada em primária ou oportunista, sendo que *C. gattii*, geralmente ocorre primariamente acometendo, em sua maioria, indivíduos imunocompetentes enquanto que, *C. neoformans* é oportunista em indivíduos com imunossupressão celular, em particular portadores do HIV.

A doença tem sido relatada com maior prevalência na faixa etária dos 30 aos 60 anos (ALMEIDA; MACHADO, 2014; FRANÇA, 2015; MEZZARI et al., 2013). Segundo estudo de França (2015), 69% dos pacientes estavam na faixa etária dos 30 aos 59 anos, sendo que 37% situavam-se entre 30 aos 39. Resultados semelhantes foram obtidos por Mezzari et al., (2013) que ao analisarem 42 prontuários médicos entre janeiro de 2012 e julho de 2013 relataram que 81% dos pacientes encontravam-se na faixa etária dos 30 aos 59 anos, sendo que aproximadamente 50% estavam entre 30 aos 39 anos.

Alguns pesquisadores relatam o predomínio de casos de criptococose sob a população masculina (MASCARENHAS-BATISTA; SOUZA; SACRAMENTO, 2013; SILVA et al., 2008). Almeida (2012) ao estudar o perfil clínico-epidemiológico dessa micose obteve 64,30% dos casos, em homens. O autor associa essa alta porcentagem com a maior exposição ocupacional dos homens aos agentes fúngicos. Resultados concordantes foram encontrados por Darzé et al., (2000) que ao analisarem as características clínicas e laboratoriais de 104 casos de meningite criptocócica obtiveram que 61,5% eram do sexo masculino.

Mezzari et al., (2013) evidenciaram uma prevalência de 55 % dos casos em homens, no entanto, justificaram o ambiente hormonal feminino com importante função de defesa frente essa infecção.

Em trabalho desenvolvido na França, pesquisadores estudaram a influência do sexo em relação à infecção disseminada por *C. neoformans* em modelo experimental de camundongos. Os resultados mostraram que as fêmeas infectadas com o fungo produziram maiores concentrações no sangue e baço de TNF- α e IFN- γ quando comparadas com os machos. Os pesquisadores salientam que os níveis aumentados TNF- α e IFN- γ podem estar associados com os hormônios estradiol e progesterona e que fatores como sexo e idade devem ser considerados ao estudar as respostas imunes frente à criptococose (LORTHOLARY et al., 2002).

A criptococose oportunista infantil não é muito comum tendo uma prevalência de aproximadamente 1% entre crianças infectadas pelo HIV (ABADI et al., 1999). No entanto, a ocorrência de infecção por *C. gattii* em crianças e jovens imunocompetentes já é descrita na literatura sendo as regiões norte e nordeste do Brasil altamente endêmicas (CORRÊA et al., 2002, 1999; TRILLES et al., 2008).

Segundo o Ministério da Saúde, a criptococose causada por *C. gattii* está, principalmente, relacionada a regiões tropicais e subtropicais, podendo ocorrer em áreas de clima temperado. *C. gattii* foi descrito, ambientalmente, pela primeira vez na Austrália associado a árvores de *Eucalyptus camaldulensis*, contudo, já foi encontrado em diversas regiões e diferentes nichos ecológicos não expressando relação específica com o eucalipto (BRASIL, 2012).

Kidd et al., (2004) investigaram isolados clínicos e ambientais de um surto causado por *C. gattii* na ilha de Vancouver, Canadá demonstrando indícios de adaptação desse patógeno ao clima temperado. Entre as amostras ambientais analisadas, *C. gattii* foi isolado em solo, ar, restos vegetais e em várias espécies de árvores, como: *Arbutus menziensis*, *Alnus spp.*, *Cedrus spp.* e *Pseudotsuga spp.* evidenciando que esse agente não expressa um padrão específico de nicho ecológico. Com relação aos casos humanos, o tipo molecular VGII foi predominante acometendo na maioria indivíduos imunocompetentes.

Estudo realizado por Datta et al., (2009) mostra a disseminação de *C. gattii* na região noroeste do pacífico dos Estados Unidos, mais especificamente, nos estados de Oregon e Washington e concluem a emergência desse patógeno no país corroborando com a ideia de adaptação do *C. gattii* a climas temperados.

Cogliati (2013) investigou, mundialmente, a distribuição geográfica e molecular de isolados clínicos e ambientais de *C. gattii* e *C. neoformans*. O Brasil foi o quarto país com maior número de isolados (5.709) sendo identificados os genótipos VGII, VGI e VGIII de *C. gattii*.

Segundo Trilles et al., (2008), *C. gattii* expressa uma tendência geográfica no Brasil e está relacionado à macrorregião Norte (Amazonas, Bahia, Pernambuco, Piauí e Roraima) sendo o VGII o tipo molecular prevalente.

Corrêa et al.,(1999) relataram 19 casos de criptococose em crianças, diagnosticados em Belém, PA, sendo 9 casos associados ao *C. gattii*. A média de idade destes pacientes foi 7,8 anos (variação, 5-13 anos) sendo 5 meninas e 4 meninos. Cinco foram a óbito em três meses apesar do tratamento com anfotericina B (associada com fluconazol 3 ou fluocitosina 1) configurando uma mortalidade de aproximadamente 56%. Entre as crianças acometidas por *C. neoformans* (10) a mortalidade foi de 10% (1) ressaltando que *C. gattii* é mais refratário à terapêutica antifúngica causando maior porcentagem de mortalidade.

Outro estudo realizado na região norte analisou 56 isolados obtidos de 43 pacientes diagnosticados com criptococose entre os anos de 2003 a 2007, dos quais 28 foram identificados como *C. neoformans* VNI (50%), seguido de 25 isolados de *C. gattii* VGII (44,64%) e 3 de *C. gattii* VGI (5,26%). *C. gattii* causou infecção em 65,5% dos pacientes HIV-negativos, enquanto que, *C. neoformans* foi responsável por 85,5% das infecções em pacientes HIV- positivos. A prevalência de *C. gattii* na região norte em casos pediátricos foi evidenciada ocorrendo oito casos em crianças menores de 12 anos sendo seis deles por *C. gattii* VGII e um por VGI. Ocorreu um caso, em criança, por *C. neoformans* genotipado como VNI (SANTOS et al., 2008).

Apesar das regiões Sul e Sudeste demonstrarem predomínio da criptococose oportunista causada por *C. neoformans*, a ocorrência de infecção por *C. gattii* nessas regiões já foi descrita. Pinto Junior et al., (2010) registraram um caso de meningoencefalite causada por *C. gattii* (VGII) em uma criança no estado do Rio de Janeiro reforçando a importância da vigilância desse agente, visto que o mesmo tem demonstrado características de adaptação e dispersão territorial podendo estar se dispersando para região sudeste brasileira.

Santos (2012) investigou os tipos moleculares de 55 isolados clínicos e ambientais de *C. gattii* no estado de São Paulo. Entre os 50 isolados clínicos, 94% expressavam o tipo molecular VGII e 6% VGI. Entre as cinco amostras ambientais

60% foram do tipo VGII e 40% VGI, evidenciando o predomínio do genótipo VGII nas infecções ocasionadas por *C. gattii*.

Lomes et al., (2016) revisaram 29 prontuários médicos de pacientes HIV negativos e não transplantados que haviam sido diagnosticados com criptococose no período de 2007 a 2014 no Hospital Emílio Ribas em São Paulo. Entre os 29 pacientes hospitalizados, 11 isolados foram obtidos na cultura, sendo 7 *C. gattii* e 4 *C. neoformans*. Os isolados viáveis foram genotipados e analisados quanto a sua susceptibilidade ao fluconazol. A criptococose foi prevalente no sexo masculino sendo o genótipo VGII mais isolado em cultura. Quanto à susceptibilidade, *C. gattii* mostrou maiores CIMs quando comparado com os isolados de *C. neoformans*, demonstrando maior resistência dessa espécie ao fluconazol.

Alguns autores relatam que a infecção causada por *C. gattii* apresenta particularidades quando comparada ao *C. neoformans*. A presença de hidrocefalia, maior ocorrência de criptococomas cerebrais e pulmonares, sequelas neurológicas e terapia antifúngica prolongada são características da infecção por essa espécie (LEAL, 2006; SEVERO; GAZZONI; SEVERO, 2009).

Atualmente, os pontos de corte das CIMs para espécies de *Cryptococcus* não foram determinados para nenhum dos antifúngicos pelos métodos do CLSI e EUCAST (ALVES, 2017; SANTOS, 2012). Entretanto, para o fluconazol, alguns autores consideram os pontos de corte como sensível se o isolado apresentar $CIM \leq 8 \mu\text{g/mL}$, intermediário ou sensibilidade dose dependente entre 16 a $32 \mu\text{g/mL}$ e $CIM \geq 64 \mu\text{g/mL}$ são declarados como isolados resistentes ao fluconazol (LEE et al., 2012; PFALLER et al., 1999; SMITH et al., 2015).

Trilles et al., (2004) estudaram a susceptibilidade “in vitro” de 57 isolados de *C. gattii* e 30 de *C. neoformans* frente a nove agentes antifúngicos e compararam as CIMs entre as duas espécies. *C. gattii* foram menos susceptíveis a quase todos antifúngicos testados quando comparado aos isolados de *C. neoformans*, com exceção da anfotericina B e flucitosina, que não apresentavam diferença significativa entre as espécies. Em relação ao fluconazol, *C. gattii* demonstrou CIM 90% de $32 \mu\text{g/mL}$, ao passo que, *C. neoformans* exibiu CIM 90% de $8 \mu\text{g/mL}$, evidenciando uma menor susceptibilidade de *C. gattii* a esse agente antifúngico. Os perfis de susceptibilidade distintos entre as espécies e o pior prognóstico da infecção causada por *C. gattii* justificam a necessidade da realização de mais estudos quanto a susceptibilidade desse agente.

Amaro (2006) constatou que a faixa da CIMs para fluconazol de *C. neoformans* variava de 0,125 a 8 µg/mL e para *C. gattii* de 2 a 16 µg/mL mostrando uma menor susceptibilidade dessa espécie ao fluconazol.

Espinel - Ingroff et al., (2012) investigaram a susceptibilidade “in vitro” ao fluconazol, posaconazol, itraconazol e voriconazol e verificaram que os valores da CIMs 90 para os antifúngicos testados tendem ser mais elevados para *C. gattii* quando comparado ao *C. neoformans*. O genótipo VGII apresentou valores maiores de CIM quando comparado aos outros tipos moleculares sugerindo que o genótipo pode estar correlacionado com o seu perfil de susceptibilidade.

A instalação do quadro clínico e a disseminação da criptococose é multifatorial, estando relacionada com a imunidade do hospedeiro, carga fúngica inalada e virulência da cepa (BICANIC; HARRISON, 2004).

Barbosa-Junior et al., (2013) avaliaram os fatores de virulência em isolados clínicos e ambientais de *C. gattii* e *C. neoformans*. Os 35 isolados clínicos (9 *C. gattii* e 26 *C. neoformans*), foram avaliados quanto a termotolerância (25°C, 30°C, 37°C, 40°C e 42°C), produção de ureases e proteases. Em relação à termotolerância, *C. neoformans* apresentou melhor crescimento em todas as temperaturas quando comparado aos isolados de *C. gattii*, no entanto, apenas nas temperaturas de 30°C e 42 °C houve diferença significativa entre o crescimento das duas espécies. As temperaturas de 30°C e 37°C possibilitaram melhor crescimento fúngico.

A produção enzimática foi avaliada após incubação de 24 horas, 48 horas e 7 dias. Todos os isolados clínicos demonstraram produção moderada de urease em 24 e 48 horas. No sétimo dia de incubação houve pequena diferença na produção dessa enzima entre as espécies. Todos os isolados de *C. neoformans* foram fortes produtores de urease, enquanto que, apenas um isolado de *C. gattii* não expressou produção intensa após esse período.

Quanto à produção de proteases, após 24 horas de incubação, um isolado de *C. gattii* expressou produção dessa enzima enquanto que, *C. neoformans* não a produziu. Após 48 horas, 69% dos isolados de *C. neoformans* (18) e 55% de *C. gattii* foram produtores de proteases. Após o sétimo dia a produção de proteases foi observada em todos os isolados.

Em estudo realizado por Liaw et al., (2010) de 100 isolados clínicos (99 foram *C. neoformans* sorotipo A e um como *C. gattii* sorotipo B) foram avaliadas à produção de urease, fosfolipase, cápsula e melanina. Em relação à fosfolipase, 97

isolados expressaram atividade de moderada a alta. A produção de urease foi de baixa a moderada em 77 isolados e a produção de melanina de baixa a intermediária em 89 isolados. Todos isolados produziram cápsulas. Os isolados altamente produtores de fosfolipase foram mais aderentes e causaram mais danos às células pulmonares A549 quando comparados aos isolados com baixa produção dessa enzima, evidenciando a importância da fosfolipase como fator de virulência na patogênese do *Cryptococcus*. Nesse mesmo estudo verificaram que as células melanizadas mostraram-se mais resistentes à ação da anfotericina B quando comparadas com as células não pigmentadas.

Gomes et al., (2010) verificaram que os 15 isolados clínicos (7 *C. gattii* e 8 *C. neoformans*) produziram uréase em até 48 horas de incubação em ágar Christensen, melanina em até 72 horas de incubação em agar níger assim como, cápsula e apresentaram sensibilidade a cicloheximida sendo essa, uma característica intrínseca desse gênero. A termotolerância foi observada em apenas um isolado de *C. neoformans*.

Pessoa, Silva e Gomes (2012) analisaram 16 isolados clínicos de pacientes com meningite criptocócica (9 *C. neoformans* e 7 *C. gattii*). Todos os isolados foram produtores de exoenzimas, no entanto, *C. neoformans* expressaram produção discretamente mais elevada de fosfolipases quando comparados com os isolados de *C. gattii*. Quanto à atividade das proteinases, *C. neoformans* demonstraram atividade mais acentuada que *C. gattii*. Em relação à produção de biofilme, *C. gattii* foi mais efetivo na produção desse fator que *C. neoformans*. Os autores reforçam sobre a ocorrência da formação “in vivo” de biofilmes em cateteres e a importância de mais estudos relacionando a ação dos antifúngicos com a produção de biofilme.

Sánchez, Escandón e Castañeda (2008) determinaram a atividade dos fatores de virulência produzidos por 54 isolados clínicos de *Cryptococcus*, sendo 19 *C. gattii* e 35 *C. neoformans*. Foram analisados o crescimento a 37°C, tamanho da cápsula, produção de urease, proteases, fenoloxidasas e fosfolipases.

Quanto a termotolerância, todos isolados cresceram à 37°C após 72 horas de incubação, não apresentando diferença entre o crescimento das duas espécies.

Todos isolados produziram cápsula, entretanto, *C. gattii* apresentou maior tamanho cápsular quando comparado a *C. neoformans*. Não houve diferenças significativas entre as espécies quanto a produção de proteases e uréases. No entanto, *C. gattii* expressou maior atividade das enzimas fosfolipases e

fenoloxidasas. Portanto, as duas espécies apresentaram perfis distintos de atividade o qual *C. gattii* expressou maior atividade desses determinantes de virulência, o que pode refletir no comportamento de agente primário da criptococose.

6. CONCLUSÃO

C. gattii é considerado patógeno primário da criptococose ocasionando quadros de meningoencefalite, principalmente, em jovens adultos do sexo masculino e crianças imunocompetentes menores de 13 anos.

É endêmico nas regiões Norte e Nordeste, porém está distribuído em todo Brasil incluindo as regiões Sul e Sudeste, sendo VGII o tipo molecular predominante.

Eucaliptos não mais representam habitat específico, por serem isolados também de solos, restos vegetais, ar e outras espécies de árvores.

Produzem enzimas como fenoloxidase, fosfolipases, proteinases e biofilmes podendo expressar maior atividade desses fatores quando comparado com *C. neoformans*, assim como pode também, apresentar um tamanho capsular maior.

Tem apresentado maiores concentrações inibitórias mínimas aos antifúngicos, principalmente fluconazol, demonstrando maior resistência a esse antifúngico e dificuldade de tratamento.

Tais achados podem justificar o comportamento de agente primário da criptococose e dificuldade no tratamento. Portanto, o profissional de saúde deve estar atento à ocorrência de infecção em pacientes imunocompetentes de faixa etária que não costuma estar associada à AIDS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADI, J. et al. Cryptococcosis in Children with Aids. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, n. 2, p. 309-313, 1999.

ALMEIDA, J. C. DE. **Perfil clínico – epidemiológico da criptococose em pacientes hiv positivos atendidos em uma unidade de referência em Belém do Pará**. 2012. 80f. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) - Universidade Federal do Pará, Pará, 2012.

ALMEIDA, R. L. G.; MACHADO, E. R. *Cryptococcus spp.* in Patients with HIV/AIDS: Literature Review. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**. Universidade Anhanguera Campo Grande, Brasil, v. 18, n. 1, p. 55–63, 2014.

ALVES, E. G. et al. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224–1229, 2008.

ALVES, I. A. **Modelagem farmacocinética-farmacodinâmica de antifúngicos azólicos em animais infectados por *Cryptococcus neoformans***. 2017. 105f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

AMARO, M. C. D. O. **Caracterização de isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* quanto à susceptibilidade a fluconazol**. 2006. 80f. Dissertação (Mestrado Biologia Celular e Molecular) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

BALTAZAR, L. M.; RIBEIRO, M. A. Primeiro isolamento ambiental de *Cryptococcus gattii* no Estado do Espírito Santo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 41, n. 5, p. 449–453, 2008.

BARBOSA JUNIOR, A. M. et al. Biological activity of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from clinical and environmental isolates. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 49, n. 3, p. 160–168, 2013.

BARBOZA, L. S. **Estudo microbiológico: amostragem de *Cryptococcus sp* em São José do Rio Preto/sp**. 2011. 85f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2011.

BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 14:1 medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. **Wiley Online Library**, v. 27, p. 875–904, 2010.

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

BONFIETTI, L. X. et al. Diversidade de isolados clínicos de *Cryptococcus gattii* por Multi-locus sequence typing no Estado de São Paulo. **Boletim Instituto Adolfo Lutz**, v. 24, n. 1, p. 36–39, 2014.

BRASIL. **Vigilância e Epidemiológica Da Criptococose**. BRASÍLIA, 2012.

CASALI, A. K. et al. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus*

neoformans isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **FEMS Yeast Research**, v. 3, n. 4, p. 405–415, 2003.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED) **Diagnosis and Testing for *C. gattii* Infection**. Atlanta: CDC, 2015. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/fungal/diseases/cryptococcosis-gattii/diagnosis.html>> Acesso em 20 de nov 2018.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution. **Clinical and laboratory standards institute**, v. 3, n. April, 2008.

COGLIATI, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. **Scientifica**, v. 2013, n. serotype D, p. 1–23, 2013.

CORRÊA, M. D. P. S. C. et al. The spectrum of computerized tomography (CT) findings in central nervous system (CNS) infection due to *Cryptococcus neoformans* VAR. *gattii* IN immunocompetent children. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 5, p. 283–287, 2002.

CORRÊA, M. DO P. S. C. et al. Criptococose em crianças no Estado do Pará , Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 5, p. 505–508, 1999.

COX, G. M. et al. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 443–448, 2000.

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

CUENCA-ESTRELLA, M. et al. Comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility system with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) broth microdilution reference methods and with the Sensititre Ye. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 1782–1786, 2010.

DARZÉ, C. et al. Características clínicas laboratoriais de 104 casos de meningoencefalite criptocócica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina**

Tropical, v. 33, n. 1, p. 21–26, 2000.

DATTA, K. et al. Spread of *Cryptococcus gattii* into Pacific Northwest Region of the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. 1185–1191, 2009.

ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 7, p. 1642–1644, 1990.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex: An international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 5898–5906, 2012.

ESPINEL-INGROFF, A.; KIDD, S. E. Current trends in the prevalence of *Cryptococcus gattii* in the United States and Canada. **Infection and Drug Resistance**, v. 8, p. 89–97, 2015.

EUCAST. “EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 7.3 Method for the Determination of Broth Dilution Minimum Inhibitory Concentrations of Antifungal. p. 1–21, 2015.

FILIÚ, W. F. DE O. et al. Cativairo de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande , Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 6, p. 591–595, 2002.

FRANÇA, J. S. DE. **Características clínicas, epidemiológicas e laboratoriais da criptococose no distrito federal no período de 2006 a 2013**. 2015.112f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

GAO, L. W. et al. Clinical characteristics of disseminated cryptococcosis in previously healthy children in China. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, 2017.

GATES, M. A.; THORKILDSON, P.; KOZEL, T. R. Molecular architecture of the *Cryptococcus neoformans* capsule. **Molecular Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 13–24, 2004.

GATTI, F.; EECKELS, R. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans*.pdf. **Ann. Soc. belge Med. trop.**, v. 50, n. 6, p. 689–694, 1970.

GOMES, F. S. et al. Quimiotipagem e caracterização fenotípica de *Cryptococcus* isolados em Belém, Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 4, p. 43–49, 2010.

GRAYBILL, J. R. et al. Fluconazole versus *Candida albicans*: A complex relationship. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 11, p. 2938–2942, 1998.

JESUS, R. S. DE. **Avaliação da formação de biofilme de fungos emergentes e sua susceptibilidade a antifúngicos na forma livre e nanoencapsulada.** 2013.132f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

KIDD, S. E. et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 49, p. 17258–17263, 2004.

KNOKE, M.; SCHWESINGER, G. One hundred years ago: the history of cryptococcosis in Greifswald. Medical mycology in the nineteenth century. **Mycoses**, v. 37, n. (7-8), p. 229–233, 1994.

KON, A. S. et al. Consenso em criptococose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 524–544, 2008.

KRONSTAD, J. W. et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 193–203, 2011.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E.; THEODORE, T. S. *Cryptococcus bacillisporus* sp. nov.: Serotype B-C of *Cryptococcus neoformans*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 28, n. 4, p. 616–620, 1978.

KWON-CHUNG, K. J.; et al. (1557) Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. honduricus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota , Hymenomycetes , Tremellomycet- idae). **Taxon**, v. 51, p. 804–806, 2002.

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de micologia médica.** 9. ed. São Paulo: Editora Sarvier, 2002

LEAL, A. L. **Diferenciação das espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* utilizando a metodologia de PCR multiplex e determinação do perfil epidemiológico de pacientes com meningite criptocócica.**

2006.100f.Dissertação (Mestrado Biologia Celular e Molecular) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

LEE, C. H. et al. Correlation of anti-fungal susceptibility with clinical outcomes in patients with cryptococcal meningitis. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, n. 361, p. 9, 2012.

LIAW, S.-J.; WU, H.-C.; HSUEH, P.-R. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan: serotypes, mating types, molecular types, virulence factors, and antifungal susceptibility. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 6, p. 696–703, 2010.

LINDSLEY, M. D. et al. Evaluation of a newly developed lateral flow immunoassay for the diagnosis of cryptococcosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 4, p. 321–325, 2011.

LOMES, N. R. et al. Cryptococcosis in non-HIV/non-transplant patients: A Brazilian case series. **Medical Mycology**, v. 54, n. 7, p. 669–676, 2016.

LORTHOLARY, O. et al. Influence of gender and age on course of infection and cytokine responses in mice with disseminated *Cryptococcus neoformans* infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n. 1, p. 31–37, 2002.

MA, H.; MAY, R. C. Virulence in *Cryptococcus* species. **Advances in Applied Microbiology**, v. 67, p. 131–190, 2009.

MACHADO, H. A. DA S. **Prevalência do antígeno criptocócico utilizando Lateral Flow Assay (LFA) no screening de pacientes com HIV/AIDS**. 2015.68f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) –Instituto Oswaldo Cruz, Teresina, 2015.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Biofilm Formation by *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 3, 2015.

MASCARENHAS-BATISTA, A. V.; SOUZA, N. M.; SACRAMENTO, E. Fatores prognósticos na meningite Criptocócica em hospital de referência para doenças infecciosas. **Revista Baiana de Saude Publica**, v. 37 s1, n. 1, p. 68–89, 2013.

MENDES, F. E. S. **Correlação entre a susceptibilidade in vitro e a atividade in vivo do fluconazol em modelo murino de infecção cerebral causada por *Cryptococcus gattii***. 2009.103f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) -

Universidade Vale do Rio Doce, Governador Valadares, 2009.

MEYER, W. et al. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA - a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. **Electrophoresis**, v. 20, n. 8, p. 1790–1799, 1999.

MEZZARI, A. et al. Criptococose em um Hospital Público de Porto Alegre: dados epidemiológicos. **Journal of Infection Control**, v. 2, n. 3, p. 130–134, 2013.

MOREIRA, T. D. A. et al. Criptococose: Estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 255–258, 2006.

ODOM, A. et al. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **EMBO Journal**, v. 16, n. 10, p. 2576–2589, 1997.

OLSZEWSKI, M. A. et al. Urease Expression by *Cryptococcus neoformans* Promotes Microvascular Sequestration, Thereby Enhancing Central Nervous System Invasion. **American Journal of Pathology**, v. 164, n. 5, p. 1761–1771, 2004.

PAPPALARDO, M. C. S. M.; MELHEM, M. S. C. Cryptococcosis: A review of the Brazilian experience for the disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 45, n. 6, p. 299–305, 2003.

PEDROSO, R. DOS S.; CANDIDO, R. C. Diagnóstico Laboratorial da Criptococose. **NewsLab**, v. 77, n. January, p. 94–102, 2006.

PEREA, S.; PATTERSON, T. F. Antifungal Resistance in Pathogenic Fungi. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 9, p. 1073–1080, 2002.

PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*: The yeast that likes it hot. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 4, p. 463–468, 2006.

PERFECT, J. R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 3, p. 291–322, 2010.

PESSOA, C. C. B.; SILVA, S. H. M. DA; GOMES, F. S. Produção de fatores de virulência in vitro por isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* de

origem clínica em Belém, Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, n. 2, p. 59–65, 2012.

PFALLER, M. A. et al. In vitro activities of voriconazole, fluconazole, and itraconazole against 566 clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from the United States and Africa. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 1, p. 169–171, 1999.

PINTO JUNIOR, V. L. et al. *Cryptococcus gattii* molecular type VGII as agent of meningitis in a healthy child in Rio de Janeiro, Brazil: report of an autochthonous case. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p. 746–748, 2010.

RODERO, L. et al. G484S Amino Acid Substitution in Lanosterol 14- α Demethylase (ERG11) Is Related to Fluconazole Resistance in a Recurrent *Cryptococcus neoformans* Clinical Isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 11, p. 3653–3656, 2003.

SAAG, M. S. et al. Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 4, p. 710–718, 2000.

SABIITI, W.; MAY, R. C. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Future Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1297–1313, 2012.

SÁNCHEZ, A.; ESCANDÓN, P.; CASTAÑEDA, E. Determinación in vitro de la actividad de los factores asociados con la virulencia de aislamientos clínicos del complejo *Cryptococcus neoformans*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, n. 3, p. 145–149, 2008.

SANTOS, D. C. D. S. **Caracterização fenotípica e genotípica de isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus gattii* do estado de São Paulo**. 2012.83f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São, São Paulo, 2012.

SANTOS, W. R. A. DOS et al. Primary endemic Cryptococcosis gattii by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 8, p. 813–818, 2008.

SEVERO, C. B.; GAZZONI, A. F.; SEVERO, L. C. Capítulo 3 - Criptococose pulmonar. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 11, p. 1136–1144, 2009.

SHI, M. et al. Real-time imaging of trapping and urease- dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 5, p. 1683–1693, 2010.

SILVA, P. et al. Suscetibilidade to antifungal agents among *Cryptococcus neoformans* varieties isolated from patients at a university hospital. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 2, p. 158–162, 2008.

SIONOV, E. et al. Heteroresistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* is intrinsic and associated with virulence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 7, p. 2804–2815, 2009.

SMITH, K. D. et al. Increased Antifungal Drug Resistance in Ugandan Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7197–7204, 2015.

SRIKANTA, F. H.; SANTIAGO-TIRADO; DOERING, T. L. *Cryptococcus neoformans*: Historical curiosity to modern pathogen. **NIH Public Access**, v. 31, n. 2, p. 47–60, 2015.

TRILLES, L. et al. In vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4815–4817, 2004.

TRILLES, L. et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 455–462, 2008.

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

WALSH, T. J. et al. Ventriculoatrial shunt infection due to *Cryptococcus neoformans*: an ultrastructural and quantitative microbiological study. **Neurosurgery**, v. 18, n. 3, p. 373–375, 1986.

ZARAGOZA, O. et al. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Applied Microbiology**, v. 2164, n. 09, p. 1–64, 2010.