



PAMELLA DE BRITO XIMENES

**PERFIL DE CARBOIDRATOS DE PAREDE CELULAR DE *CRYPTOCOCCUS*
NEOFORMANS E CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DO BIOFILME PARA
AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO DA CRIPTOCOCOSE EXPERIMENTAL**

**RECIFE
FEVEREIRO/2014**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**PERFIL DE CARBOIDRATOS DE PAREDE CELULAR DE *CRYPTOCOCCUS*
NEOFORMANS E CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DO BIOFILME PARA
AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO DA CRIPTOCOCOSE EXPERIMENTAL**

NOME: PAMELLA DE BRITO XIMENES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: MICOLOGIA MÉDICA

Orientadora: Dr^a. REJANE PEREIRA NEVES

Co-orientadora: Dr^a. DANIELLE PATRÍCIA
CERQUEIRA MACÊDO

RECIFE

FEVEREIRO/2014

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Ximenes, Pamella de Brito

Perfil de carboidratos de parede celular de *Cryptococcus neoformans* e capacidade de formação do biofilme para avaliação do tratamento da criptococose experimental / Pamella de Brito Ximenes. – Recife: O Autor, 2014.

58 f.: il.

Orientadoras: Rejane Pereira Neves, Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, 2014.

Inclui referências e anexos

1. Micologia médica 2. Fungos I. Neves, Rejane Pereira (orient.) II. Macêdo, Danielle Patrícia Cerqueira III. Título.

616.96901

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-155

**PERFIL DE CARBOIDRATOS DE PAREDE CELULAR DE *CRYPTOCOCCUS*
NEOFORMANS E CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DO BIOFILME PARA
AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO DA CRIPTOCOCOSE EXPERIMENTAL**

PAMELLA DE BRITO XIMENES

Aprovada em: 26/02/2014

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Dr^a. Rejane Pereira Neves – (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Ana Maria Rabelo de Carvalho Parahym
Universidade Federal de Pernambuco

**A Deus e
à minha família
dedico.**

Agradecimentos

A Deus e a nossa senhora, por estarem presentes em cada momento da minha vida, iluminando sempre os meus passos.

A minha mãe Maria dos Praseres de Brito Lucena Ximenes e ao meu pai José Lelis Ximenes, por todo amor, carinho, compreensão e incentivo.

A minha família, em especial a minha tia Maria Estela e ao meu tio José Laércio, por todo apoio, carinho e paciência.

Ao meu namorado Rafael Vilela, por toda dedicação, companheirismo e amor.

A minha orientadora Prof^a Dra. Rejane Pereira Neves, pela oportunidade, confiança e ajuda na superação das dificuldades enfrentadas.

A minha co-orientadora Prof^a Dra. Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo, pelas palavras de carinho e apoio para a realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ao Departamento de Micologia da UFPE, por possibilitar a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do LIKA, pela disponibilidade do microscópio de fluorescência e apoio para a sua utilização.

Ao professor Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão, por ceder as lectinas e seus conhecimentos.

Ao professor Dr. Almir Gonçalves Wanderley, pela autorização do uso do Biotério de Farmacologia e Toxicologia Pré-Clínica de Produtos Bioativos da UFPE.

Ao professor Dr. Nicodemos Teles Pontes Filho, pela avaliação histopatológica.

Aos professores Dr. Armando Marsden Lacerda Filho, Dra. Oliane Maria Correia Magalhães, Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto, Dra. Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti pela amizade, ensinamentos e incentivo.

A minha amiga Maria Daniela Silva Buonafina, por todo carinho e parceria.

Ao meu amigo Silvio Francisco Pereira Júnior, por toda paciência e amizade que a mim dedicou.

Aos meus amigos e colegas do Departamento de Micologia, Michellângelo, Melyna, Franz, Nadyr, Caroline Sanuzi, Patrícia, Fabíola, Elvislene, Suanni, Ana Paula, Cícero, Flávio, Carolina Maria, Ana Maria, André, José, Aline, Carliane, Sérgio, Ildnay, Heloísa, Thaís, Carlos, Diogo, Mayra, Nelson, Marília, Jadson, Natália, Danielle Karla e Ingrid, por estarem sempre dispostos a me ajudar e pelos momentos de descontração.

Aos meus queridos amigos, Tiago, Bianka, Alexsandra, Nathalie, Pâmella, Ewerton e Djair, por todo carinho e incentivo para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

O *Cryptococcus neoformans*, levedura capsulada, acomete geralmente de forma disseminada imunossuprimidos, com predileção pelo sistema nervoso central. Os glicoconjugados da cápsula podem ser evidenciados por marcação com lectinas, que possuem especificidade a diversos carboidratos distintos. As lectinas desempenham atividades biológicas, e desta forma podem reconhecer padrões de expressão de glicoproteínas relacionadas a processos patológicos e maturação celular. Ainda nos processos patológicos, a capacidade desta levedura na formação do biofilme indica maior possibilidade de dano ao hospedeiro. Assim, essa pesquisa objetivou definir o perfil de virulência de *C. neoformans* quanto aos carboidratos da parede celular, capacidade de formação de biofilme e avaliação do tratamento da criptococose experimental. Foram avaliados 30 isolados utilizando as lectinas ConA, WGA, UEA-I e PNA conjugadas a flurosceína. Para formação do biofilme foi utilizado meio mínimo para o crescimento do fungo e os resultados foram avaliados visualmente. A criptococose experimental foi reproduzida com uma cepa capaz de produzir biofilme, segundo perfil *in vitro*, sendo tratado com anfotericina B. A lectina *wheat germ agglutinin* (WGA) foi aquela mais reconhecida pelos carboidratos. Todos os isolados formaram biofilme sem variação de intensidade. Após o tratamento, foi demonstrada a resistência a terapêutica antifúngica. Portanto, verifica-se que a composição da superfície com maior expressão de N-acetil-glicosamina em *Cryptococcus* contribui para formação do biofilme, proporcionando maior resistência à anfotericina B no tratamento experimental.

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*. Lectinas. Biofilme. Criptococose experimental.

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans encapsulated yeast, usually affects immunosuppressed disseminated form, with a predilection for the central nervous system. The glycoconjugates of the capsule may be evidenced by staining with lectins that have specificity to several different carbohydrates. The lectins play biological activities, and therefore can recognize the expression patterns of pathological processes related to the glycoproteins and cell maturation. Even in pathological processes, the ability of this strain in biofilm formation indicates a higher possibility of damage to the host. Thus, this research aimed to establish the profile of virulence of *C. neoformans* as the cell wall carbohydrates, the ability of biofilm formation and evaluation of the treatment of experimental cryptococcosis. 30 isolates were evaluated using ConA, WGA, UEA - I and PNA lectins conjugated to fluorescein. For biofilm formation was minimal medium used for growth of the fungus and the results were evaluated visually. The experimental cryptococcosis was reproduced with a strain able to produce biofilm, second profile in vitro, and treatment with amphotericin B. The lectin wheat germ agglutinin (WGA) was the most recognized by carbohydrates. All isolates formed biofilm with no intensity variation. After treatment was demonstrated resistance to antifungal therapy. Therefore, it is seen that the surface composition with increased expression of N-acetylglucosamine on *Cryptococcus* contributes to biofilm formation, providing greater resistance to amphotericin B in the experimental treatment.

Key-words: *Cryptococcus neoformans*. Lectin. Biofilm. Experimental cryptococcosis.

Lista de abreviaturas

µm	Micrometro
GXM	Glicuronoxilomanana
GalXM	Galactoxilomanana
MP	Manoproteínas
HIV	Vírus da Imunodeficiência adquirida
SNC	Sistema Nervoso Central
C.	<i>Cryptococcus</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior
MAT	Mating
Var.	Variedade
Mb	Megabases
°C	Grau Celsius
pH	Potencial hidrogeniônico
CO ₂	Dióxido de Carbono
KDa	Quilo Daltons
α	Alpha
β	Beta
GlcA	Ácido glucurônico
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
LCR	Líquido Céfalorraquidiano
Cm	Centímetro
BHI	Infusão de cérebro-coração
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
L-CGB	L-canavanina, glicina e azul de bromotimol
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
rDNA	Ácido Desoxoribonucleico ribossomal
TLR	Toll like receptors
IL	Interleucina
MHC	Molécula de histocompatibilidade
Ags	Antígenos
APC	Célula apresentadora de antígeno
UV	Ultravioleta
ssp	Espécies
CRD	Domínio de Reconhecimento de Carboidrato
URM	University Recife Mycologia
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
mL	Mililitro
mg	Miligrama
mM	Milimolar
MgSO ₄ · 7H ₂ O	Sulfato de magnésio heptahidratado
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
RPM	Rotações por minuto
PBS	Tampão fosfato-salino
µg	Micrograma
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Con A	Concanavalin A
WGA	Wheat germ agglutinin
UEA-I	Ulex europeus agglutinin I
PNA	Peanut agglutinin

h	Horas
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo-Azami
IS	Imunossuprimido
IC	Imunocompetente
n	Número
Kg	Quilograma
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
w/v	Massa/volume
UFC	Unidade formadora de colônia
mm	Milímetro

Lista de figuras

Capítulo 1	Pág.
Figura 1 – Padrões de fluorescência de coloração de lectina a partir de isolados clínicos de <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> . A coloração foi intensa (A) com aglutinina de gérmen de trigo (WGA), moderada (B) com concanavalina A (Con A) e fraca (C, D) com aglutinina de amendoim (PNA) e aglutinina <i>Ulex europaeus</i> I (UEA-I). Controles positivos (E) e negativos (F) dos padrões de fluorescência.....	36
Capítulo 2	
Figura 1 - Formação de biofilme por isolados clínicos de <i>Cryptococcus neoformans</i> mantidos na coleção de cultura URM.....	45
Figura 2 - Avaliação do <i>Cryptococcus neoformans</i> URM 6902 em amostra de pulmão de animal Imunossuprimido e infectado. (A) Exame direto demonstrando a presença de células de leveduras encapsuladas; (B) Cultura demonstrando a presença de colônias brancas e mucóides.....	46

Lista de tabelas

Capítulo 1	Pág.
Tabela 1 – Cepas de <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> e padrões de fluorescência de coloração com lectina.....	35
Capítulo 2	
Tabela 1 - Média da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em camundongos infectados com <i>Cryptococcus neoformans</i> URM 6902 tratados com anfotericina B e grupos controles.....	46

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1 HISTÓRICO.....	16
2.2 ASPECTOS TAXONÔMICOS E CICLO DE VIDA.....	17
2.3 HABITAT.....	18
2.4 FATORES DE VIRULÊNCIA.....	18
2.5 CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	20
2.6 CRIPTOCOCOSE.....	21
2.7 DIAGNÓSTICO.....	23
2.8 LECTINAS.....	26
2.9 MECANISMOS DE DEFESA DO SISTEMA IMUNOLÓGICO.....	27
2.10 TRATAMENTO.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1. CULTURAS.....	30
3.2. CARACTERIZAÇÃO DAS LEVEDURAS QUANTO A EXPRESSÃO DE CARBOIDRATOS NA PAREDE CELULAR – ENSAIO DE MARCAÇÃO COM LECTINAS.....	30
3.2.1 Cepas de <i>Cryptococcus</i>	30
3.2.2 Microscopia de Fluorescência.....	30
3.2.3. Alvos de WGA em <i>C. neoformans</i>	31
3.3. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	31
3.4. ANÁLISE <i>IN VIVO</i> DA VIRULÊNCIA DE <i>cryptococcus neoformans</i>	31
3.4.1. Animais e protocolo de imunossupressão.....	31
3.4.2. Modelo de infecção por <i>Cryptococcus neoformans</i>	31
3.4.3. Tratamento da criptococose disseminada com anfotericina B.....	32
3.4.4. Quantificação de <i>Cryptococcus neoformans</i> e exame histológico.....	32
4. VISANDO A PAREDE CELULAR DE <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> USANDO LECTINAS: ESTUDO DO DOMÍNIO DE LIGAÇÃO AOS CARBOIDRATOS.....	33
4.1. RESUMO.....	33
4.2. INTRODUÇÃO.....	33

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.4. SEÇÃO EXPERIMENTAL.....	38
4.4.1. Cepas de <i>Cryptococcus</i> e condições de crescimento.....	38
4.4.2. Ligação de lectina à parede celular criptocócica.....	38
4.5. AGRADECIMENTOS.....	39
4.6. CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES.....	39
4.7. CONFLITOS DE INTERESSE.....	39
4.8. REFERÊNCIAS.....	39
5. FORMAÇÃO DE BIOFILME POR <i>Cryptococcus neoformans</i>: AVALIAÇÃO EM MODELO EXPERIMENTAL IN VIVO E ASSOCIAÇÃO COM A RESISTÊNCIA TERAPÊUTICA.....	41
5.1. RESUMO.....	41
5.2. INTRODUÇÃO.....	41
5.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
5.3.1. Avaliação da capacidade de formação de biofilme.....	42
5.3.2. Análise <i>in vivo</i> da virulência de <i>Cryptococcus neoformans</i>	43
5.3.2.1. Animais e protocolo de imunossupressão.....	43
5.3.2.2. Modelo de infecção por <i>Cryptococcus neoformans</i>	43
5.3.2.3. Tratamento da criptococose disseminada com anfotericina B.....	43
5.3.2.4. Quantificação de <i>Cryptococcus neoformans</i>	43
5.4. RESULTADOS.....	44
5.4.1. Avaliação da capacidade de formação de biofilme.....	44
5.4.2. Protocolo de imunossupressão.....	44
5.4.3. Modelo de infecção por <i>Cryptococcus neoformans</i>	44
5.4.4. Tratamento da criptococose disseminada com anfotericina B.....	44
5.4.5. Quantificação de <i>Cryptococcus neoformans</i>	44
5.5. DISCUSSÃO.....	44
6. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	47
REFERÊNCIAS.....	48

1. INTRODUÇÃO

As leveduras são fungos que se apresentam geralmente na forma de células únicas e possuem a capacidade de se reproduzir por brotação ou fissão (Alexopoulos; Mims; Blackwell, 1996). Os blastosporos podem formar pseudo-hifas, que são caracterizadas por cadeias de células alongadas apresentando constrições no local dos septos (Kwon-Chung; Bennet, 1992). O *Cryptococcus neoformans* é uma levedura que se reproduz assexuadamente por brotamento, podendo apresentar uma fase sexuada, neste caso passa a ser denominada *Filobasidiella neoformans* (Birchard; Sherding, 1998).

Esta levedura apresenta caráter oportunista, produz cápsula mucopolissacarídica e apresenta tropismo pelo sistema nervoso central, sobretudo de imunossuprimidos, causando especialmente meningoencefalite de alto risco (Vecchiarelli, 2000). A cápsula deste fungo apresenta como principal componente polissacarídico a glucuronaxilomanana (GXM), considerado um dos principais fatores de virulência, por se acumular nos tecidos durante a infecção (Casadevall; Perfect, 1998). Outro importante fator de virulência é a formação de biofilme e tem sido associada a liberação de GXM (Martinez; Casadevall, 2005).

Biofilme criptocócico consiste no enredamento de células de levedura em uma quantidade essencial de matriz de polissacarídeo (Martinez; Casadevall, 2006). A formação desta estrutura pode está associada a infecção fúngica, tornando esta, persistente e resistentes à tratamento antifúngico e a mecanismos imunológicos do hospedeiro (Hall-Stoodley; Costerton; Stoodley, 2004; Ramage et al., 2012).

O processo de caracterização de polissacarídeos ou glicoconjugados pode ser realizado com o auxílio de lectinas, que possuem especificidades aos diferentes tipos de carboidratos (Matsui et al., 2001). As lectinas são utilizadas como marcadores celulares específicos, e se destacam por proporcionarem diversas atividades biológicas, podendo reconhecer variações nos padrões de expressão de glicoproteínas relacionadas a processos patológicos e maturação celular (Ambrosi et al., 2005).

A criptococose meníngea mantém-se como uma das principais doenças oportunistas nos países em desenvolvimento e nos países desenvolvidos nos quais se constata uma elevada incidência de infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (Jarvis; Harrison, 2007). Desta forma, torna-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que definam o perfil de virulência do *C. neoformans*, para que tratamentos mais eficazes sejam futuramente propostos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 HISTÓRICO

A primeira descrição de *Cryptococcus neoformans* ocorreu em 1894, pelos médicos alemães Otto Busse e Abraham Buschke, que relataram a presença de corpúsculos arredondados em uma lesão na tíbia de uma mulher de 31 anos, o qual foi cultivado e denominado de *Saccharomyces hominis* (Buschke, 1895). Ainda em 1894, foi isolado na Itália por Sanfelice, uma levedura encapsulada em suco de pêssago fermentado (Sanfelice, 1894), sendo avaliada sua patogenicidade em 1895, após estudos *in vivo* com animais de laboratório, denominando-o de *Saccharomyces neoformans* (Sanfelice, 1895).

Na França, em 1896, Curtis isolou uma levedura semelhante a descrita por Sanfelice, de pacientes com abscesso na região lombar e de tumor subcutâneo na base do triângulo de Scarpa, sendo então nomeado de *Saccharomyces subcutaneus tumefasciens* (Drouhet, 1997).

O micologista Vuillemin, em 1901, demonstrou ser mais adequado a denominação *Cryptococcus*, para este gênero de levedura, pois estas não possuíam a capacidade de fermentar carboidratos e não havia formação de ascosporos como estruturas de reprodução, características fisiológicas e morfológicas observadas no gênero *Saccharomyces* (Lazéra; Igreja; Wanke, 2004).

Em 1905, Hansemann isolou a levedura em necropsia de cérebro humano e no mesmo ano dois casos de meningoencefalite pela mesma levedura foram descritos por Stoddard e Cutler, nos Estados Unidos, e denominaram o fungo de *Torula histolytica* (Kwon-Chung; Bennett, 1992).

Benham ao revisar os gêneros *Saccharomyces*, *Cryptococcus* e *Torula*, em 1935, concluiu que se tratava de um único gênero. Estabeleceu então, em 1950, o termo criptococose para a doença causada pelo agente etiológico *Cryptococcus neoformans* (Kwon-Chung; Bennett, 1992).

Alguns casos de infecção por *C. neoformans* foram relatados até o ano de 1950, porém apenas em 1952, foi observado um caso em gato, e no ano seguinte, o primeiro caso em cães (Jungerman; Schwartzman, 1972). Em 1955, Emmons observou a relação saprobiótica de *C. neoformans* com matéria orgânica, particularmente em fezes de pombos secas. Porém, também foram evidenciadas em ninhos e solos (Lazéra et al., 2000).

Em 1962, Staib observou a produção de colônias marrons, com produção de melanina por *C. neoformans*, ao ser cultivado em meios de cultura contendo extrato de fezes de aves (Kwon-Chung; Bennett, 1992).

O ciclo de vida deste fungo foi descrito em 1975 por Kwon-Chung, observando dois tipos sexuais de *C. neoformans*, *MAT α* e *MATa*. Quando cruzadas sob determinadas condições

laboratoriais, reproduziam a fase teleomófica basidiomicética *Filobasidiella*, que produzia hifas verdadeiras e basidiosporos férteis (Kwon-Chung; Bennett, 1975).

A sorotipagem desta espécie de levedura foi baseada em reação imunológica, sendo dividida em cinco sorotipos, A, B, C, D e AD (Ikeda et al., 1982). Após análises morfológicas, bioquímicas, epidemiológicas, ecológicas, fisiológicas e genéticas, a espécie ainda foi dividida em três variedades: *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A), *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C) e *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) (Kwon-Chung; Bennett, 1992). No ano de 2002, foi descrito formalmente com base em dados de análise molecular e filogenética de isolados clínicos e ambientais, as variedades que atualmente compreendem espécies distintas, sendo então classificadas como: *C. neoformans* e *C. gattii* (Kwon-Chung et al., 2002). Recentemente foi realizado o sequenciamento do genoma de duas cepas de *C. neoformans* sorotipo D (JEC21 e B3501-A). Foi sequenciado um genoma de 20 Mb, contendo 6500 genes estruturais ricos em *introns* e *transposons*, verificando ainda que o mesmo codifica genes únicos para o processo de virulência (Loftus et al., 2005).

2.2 ASPECTOS TAXONÔMICOS E CICLO DE VIDA

C. neoformans é um fungo basidiomiceto, na fase assexuada ou anamorfa apresenta células medindo aproximadamente 2-8 μm , esféricas ou globosas, isoladas ou com brotamento a partir de qualquer ponto da parede celular, os quais podem permanecer unidos, porém não há formação de pseudomicélio (Fell et al., 1998).

As células são envolvidas por uma cápsula mucopolissacarídica, com tamanho variando de 1-30 μm (Janbon, 2004). Em meios de cultura tradicionais como ágar Sabouraud, após 48 horas incubados a temperaturas de 25 a 37°C, apresentam colônias de coloração branca a creme, textura mucóide e aspecto brilhante (Lazéra; Igreja; Wanke, 2004).

A fase sexuada ou teleomórfica ainda não foi observada na natureza, porém em condições laboratoriais foi bem demonstrada, sendo denominada de *Filobasidiella neoformans* (Kwon-Chung; Bennet, 1992). Nessa fase apresenta hifas dicarióticas e a reprodução sexuada a qual ocorre na presença de dois alelos opostos no *locus* sexual *MAT α* e *MAT α* (Marra et al., 2004). Após a plasmogamia, apresentam hifas dicarióticas hialinas e ramificações regulares com ligações em ansa a partir de conjugantes. Em seguida ocorre o desenvolvimento de basídios longos, delgados, hialinos e sem septos, na porção terminal ou em ramificação lateral da hifa. Os basídios também apresentam uma dilatação no ápice em forma de clava, onde ocorre a cariogamia. Após a meiose, o núcleo zigótico origina quatro núcleos haplóides, que se dividem mitoticamente formando quatro

cadeias de até 20 basidiosporos cada, os quais podem apresentar o formato ovalado, elíptico ou globoso, com parede lisa ou levemente rugosa (Lazéra et al., 2004). Há possibilidade de realização de *mating* entre as variedades sorotipo A x sorotipo D, sorotipo B x sorotipo D e sorotipo C x sorotipo D, entretanto é reduzida a viabilidade dos basidiosporos, além de apresentar muitas progênes diplóides e aneuplóides, o que demonstra que a divergência genômica diminui a taxa de meiose (Legenler; Cox; Hetman, 2001).

2.3 HABITAT

A levedura *C. neoformans* é cosmopolita, podendo ocorrer em vários nichos ecológicos como substratos orgânicos e habitat relacionados, como estábulos, construções antigas, porões, barracões, torres de igreja, cavernas, além de excretas de aves, fezes de morcegos e baratas, solo, buracos de tatus, recintos de coelhos, ninhos de vespa, leite, suco de frutas e várias espécies vegetais. Porém, é observada principalmente em excretas de pombos urbanos, ocos de árvores vivas e material vegetal em decomposição (Lazéra et al., 2000; Trilles et al., 2003; Rosario; Acosta; Colom, 2008).

O desenvolvimento de *C. neoformans* em excretas envelhecidos de aves está relacionado com a presença de um ambiente favorável para o fungo, por apresentar menor quantidade de bactéria, diminuindo desta forma, a competição na assimilação dos nutrientes. Além disso, o fungo possui a capacidade de assimilar creatina, uma amina nitrogenada, composta de dois aminoácidos (arginina e glicina), que é uma importante fonte de nitrogênio para produção de proteínas; como também ácido úrico, purinas e xantinas (Reolon et al., 2004; Nardelli et al, 2005).

Apesar deste fungo ser isolado com frequência em excretas, dificilmente o mesmo é encontrado no aparelho digestório de aves (Rosario et al., 2008). Essa dificuldade de isolamento ocorre provavelmente pela alta concentração de amônia presente nas fezes frescas, que alcaliniza o meio e pela elevada temperatura corporal destas aves (41,5 °C) (Lin; Heitman, 2006).

2.4 FATORES DE VIRULÊNCIA

O *C. neoformans* possui uma cápsula mucopolissacarídica constituída em média por 90% de glucuronoxilomanana (GXM), 7% de galactoxilomanana (GalXM) e 3% de manoproteínas (MP). A cápsula facilita a adaptação da levedura tanto no ambiente, protegendo de predadores (nematóides e amebas) e da desidratação, como no hospedeiro, dificultando a fagocitose pelos macrófagos ou

permitindo a sua sobrevivência no interior dos mesmos, sendo por isso considerada o principal fator de virulência deste fungo (Feldmesser; Novikoff; Casadevall, 2000; Steenbergen; Shuman; Casadevall, 2001; Moyrand et al., 2002).

Em trabalhos experimentais foi observado que mutantes acapsulados não são capazes de causar infecção (Fromtling et al. 1982), por outro lado as leveduras encapsuladas são bastante virulentas e possuem a capacidade de escapar do sistema imune e se desenvolver no hospedeiro (Vechiarelli et al. 2000; Monari et al. 2006). O *Cryptococcus* se destaca por ser até o momento o único fungo encapsulado patogênico (McClelland et al. 2006). A produção da cápsula envolve alguns genes, já identificados e caracterizados: *CAP59*, *CAP64*, *CAP60* e *CAP10* (Kwon-Chung, 1998; Steenbergen; Casadevall, 2003). Algumas condições influenciam o crescimento da cápsula, como pH, temperatura, disponibilidade de CO₂, concentrações de nutrientes e de ferro livre, osmolaridade do meio e soro (Zaragoza et al., 2009).

Ao contrário dos polissacarídeos microbianos, os polissacarídeos que constituem a cápsula do *Cryptococcus* são produzidos no citoplasma e transferidos para o espaço extracelular através de vesículas. Ocorre o rompimento das vesículas e os componentes capsulares são liberados, sendo então associados à parede celular causando um aumento da cápsula (Yoneda; Doering, 2006; Rodrigues et al., 2007; Oliveira et al., 2009).

A GXM, componente majoritário da cápsula do *C. neoformans*, é um polímero de alto peso molecular, com massa molecular entre 1700-7000 kDa, é constituída por uma cadeia linear de manose com ligações α (1,3) com substituições de xilose β (1,2) e β (1,4) e resíduos de ácido glucurônico (GlcA) β (1,2) (Rodrigues; Fonseca, 2009).

A GalXM, é o segundo polissacarídeo capsular mais abundante, possuindo massa molecular de aproximadamente 100 Kda, constituída por um core central de galactose contendo ligações α (1,6) e ramificações de galactose β (1,3), manose α (1,4) e α (1,3) e de xilose β (1,3) e β (1,2) (Zaragoza et al., 2009).

As MP, proteínas de uma classe heterogênea de glicoproteínas, são consideradas as moléculas que compõem a cápsula em menor número. Várias manoproteínas já foram identificadas com base na massa molecular, dentre elas MP-1, MP-2, MP-4, MP-88, MP-98 e MP-105 (Vartivarian et al., 1989; Pitzurra et al., 1997; Walenkamp et al., 1999; Huang et al., 2002).

Apesar da cápsula ser o principal fator de virulência deste fungo, outras características também são consideradas importantes para a sua patogenicidade, como a capacidade de produzir enzimas, dentre elas a fenoloxidase que possui o potencial de oxidar substâncias fenólicas, como por exemplo a tirosina, ocorrendo a produção de um pigmento, denominado melanina o qual se acumula na parede, tornando as colônias escuras. Esse pigmento pode explicar o neurotropismo do

fungo, por ser rico em catecolaminas como a L-DOPA (Datta; Bartlett; Marr, 2009). A proteinase permite a degradação do colágeno, da elastina, do fibrinogênio, das imunoglobulinas e de fatores do Complemento, causando lesão tecidual. Com isso o *Cryptococcus* absorve nutrientes e se protege da resposta imunológica do hospedeiro (Steenbergen; Casadevall, 2003). As fosfolipases hidrolisam ésteres de glicerolfosfolipídeos, degradando as membranas das células e provocando a lise celular no hospedeiro (Ma, May, 2009). Outro fator importante é a capacidade de produzir manitol, que protege o fungo do ataque oxidativo dos fagócitos, além do *stress* osmótico e extracelular, acarretando no aumento da pressão intracraniana (Harrison, 2000). O *Cryptococcus* também consegue se sobreviver e se desenvolver em condições fisiológicas, mantendo sua curva de crescimento a 37-39 °C, perdendo sua viabilidade apenas a 40 °C após 24 h (LAZÉRA; IGREJA; WANKE, 2004).

2.5 CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

Outro aspecto relativo à virulência das células de *C. neoformans* é a capacidade de vários isolados se aderirem a superfícies, inertes ou vivas, e se organizarem em comunidades microbianas com metabolismo particular e circundado por uma matriz extracelular compondo um biofilme. Nesta organização as células fúngicas se apresentam mais resistentes a fármacos e podem produzir fontes persistentes de infecção (Martinez; Casadevall, 2006).

Os biofilmes microbianos são descritos como comunidades de micro-organismos aderidas irreversivelmente a uma superfície, produzindo uma substância polimérica extracelular e que apresentam um estado metabólico diferente ao do crescimento planctônico correspondente, principalmente com relação à transcrição e interações entre as células (Lindsay; Holy, 2008). As vantagens dos micro-organismos se estruturarem em comunidades constituem na maior capacidade de absorção de nutrientes, auxiliando no crescimento mais ordenado da comunidade e maior proteção contra desidratação, radiações UV, fagocitose, e resistência a antimicrobianos (Suzuki, 2009).

O crescimento desta estrutura pode ser observado em três fases. Na fase inicial, as células planctônicas associam-se ao substrato, formando uma interação hidrofóbica e eletrostática que em companhia de outros fatores biológicos geram uma aderência à superfície do substrato. Na fase intermediária a multiplicação das microcolônias permitem o início da síntese da matriz extracelular. Com a formação do biofilme ocorre o desenvolvimento de mecanismos de comunicação intercelular que resultam em uma expressão diferencial de genes. Na fase madura, o biofilme recém-formado é

constituído de uma transição de estruturas fúngicas, enredado pela matriz extracelular polimérica, originando crescimento tridimensional (Mukherjee, et al., 2005).

Em um biofilme maduro, as células mais próximas da superfície se tornam inativas e na fase posterior morrem por falta de nutrientes, diminuição do pH, diminuição da concentração de oxigênio e aumento de produtos tóxicos resultantes no metabolismo celular (La Tourette Prosser B. et al., 2003, Cardoso, 2004). Pesquisas atuais indicam que o crescimento primário, a maturação e o envelhecimento de um biofilme são regulados através da expressão de genes, que dependem da transmissão de sinais entre as células (La Tourette Prosser B. et al., 2003; Cardoso, 2004). A matriz do biofilme possui conexões que possibilitam a circulação de nutrientes dentro do biofilme (Dorlan; Costerton, 2002). A sinalização célula a célula, especialmente o *quorum sensing* (sensor de quorum) que equivale a um processo de comunicação intra e interespecies microbianas é importante para a formação de biofilmes microbianos. Esta ligação através de auto-reguladores impossibilita o crescimento populacional desnecessário e controla a competição por nutrientes e tem implicações fundamentais no processo infeccioso, principalmente para disseminação e estabelecimento de sítios de infecções (Dorlan, 2002; Ramage, 2005).

A formação de biofilme é um mecanismo comum, usado por microrganismos para sobreviver em lugares hostis, colonizar e se estabelecer em um ambiente novo, proporcionando proteção. As condições ideais para a formação de biofilme criptocócico são: temperatura de 25-37 °C, pH neutro e tensão de CO₂ no ambiente. Contudo, sob condições de baixa tensão de oxigênio, observa-se a presença de células planctônicas de *C. neoformans* (Ravi et al., 2009).

O desenvolvimento do biofilme por *Cryptococcus* spp. tem sido descrita com frequência como uma estratégia ligada à infecção crônica, como um resultado de resistência adquirida aos mecanismos do sistema imunológico do hospedeiro e à terapia antifúngica (Martinez; Casadevall, 2006).

Os mecanismos responsáveis pela resistência a antifúngicos também podem estar associados a fatores como limitações difusionais dos antimicrobianos pela matriz extracelular, mudanças fenotípicas das células no biofilme e ainda com a formação de mecanismos de resistência por alteração do genótipo das células (Chandra et al., 2001; Cardoso, 2004).

2.6 CRIPTOCOCOSE

A criptococose deixou de ser uma doença rara, com o surgimento da pandemia da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) na década de 80, ocupando o quarto lugar entre as doenças infecciosas que acometem indivíduos portadores desta síndrome e a principal infecção fúngica

nestes pacientes, sendo responsável pelo maior índice de morbidade e mortalidade (Casadevall; Perfect, 1998). Assim como a AIDS, outros fatores colaboraram para o aumento da incidência da doença, como a realização cada vez mais frequente de transplante de órgãos e terapia imunossupressora (Indurm et al., 2005).

Esta doença acomete principalmente indivíduos adultos, em média de 78% do sexo masculino (Leal et al., 2008). No Brasil, de acordo com dados do Ministério da saúde, entre o período de 2000 a 2007, a criptococose ocorre como primeira manifestação oportunista em 4,4 % dos casos de AIDS (Ministério da Saúde, 2012).

A criptococose é uma micose sistêmica, em pacientes imunossuprimidos se manifesta como uma doença oportunista, porém em pacientes imunocompetentes se caracteriza como uma doença primariamente patogênica. Essa relação depende da espécie que infecta o paciente, desta forma *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *grubii* são patógenos oportunistas e *C. gattii* é um patógeno primário (Indurm et al., 2005).

A infecção em humanos pode ocorrer pela inalação de propágulos infectantes, provavelmente por células de leveduras e/ou pequenos basidiosporos ($< 3 \mu\text{m}$), que se depositam facilmente nos alvéolos pulmonares, comprometendo, primariamente o pulmão, porém podendo disseminar-se para outros órgãos (Sorrel; Ellis, 1997; Perfect; Casadevall, 2002). Apesar de não ser a forma mais comum, a infecção também pode ocorrer por traumas, por meio de transplantes ou por inoculação direta nos tecidos (Perfect; Casadevall, 2002).

Através da via respiratória, o foco de infecção inicial é o pulmão e os primeiros sintomas são geralmente semelhantes aos de uma gripe. Entretanto, em indivíduos imunocompetentes pode ocorrer uma colonização de células do *C. neoformans* no trato respiratório do hospedeiro, sem causar sintomas clínicos significativos por meses ou anos (Garcia-Hermoso et al. 1999; Goldman et al. 2001). A doença quando não controlada no pulmão, poderá se disseminar para a pele, ossos, e próstata, porém esse fungo possui uma predileção para o sistema nervoso central (SNC), causando meningite e encefalite, que são os quadros clínicos mais graves da doença, podendo culminar com o óbito se não for realizado o tratamento adequado (Mitchell; Perfect, 1995; Indurm et al., 2005; Lin; Heitman, 2006).

A preferência do *C. neoformans* pelo SNC, está relacionada à presença no líquido céfalo raquidiano (LCR), de alta concentração de nutrientes assimiláveis (carboidratos, minerais, tiamina, glutamina e ácido glutâmico), à ausência de atividade do complemento e a diminuição ou falta de resposta inflamatória no tecido cerebral (Severo et al., 1998), bem como a capacidade das leveduras em converter catecolaminas, que são abundantes no cérebro, em melanina, um antioxidante importante para proteção da levedura contra a ação microbicida de leucócitos (Polacheck et al., 1982; Mitchell; Perfect, 1995).

É possível classificar a criptococose em três formas clínicas: pulmonar regressiva, pulmonar progressiva e disseminada. A pulmonar regressiva é geralmente assintomática, sendo desta forma de difícil diagnóstico. A pulmonar progressiva apresenta sintomatologia inespecífica e por vezes escassa, corresponde a 10% dos casos clínicos, pode-se observar tosse, escarro mucóide e dor torácica pleurítica. Além de lesões císticas pulmonares formada por massa densa de células fúngicas e pouca reação inflamatória do parênquima. Em achado radiológico observa-se nódulo nos lóbulos inferiores, que dificilmente calcificam, medindo geralmente mais de 3 cm de diâmetro, único e periférico. A forma disseminada é a mais comum, ocorrendo em 90% dos casos, sendo caracterizada pela disseminação do *C. neoformans* por via hematogênica, atingindo qualquer órgão ou sistema, porém este fungo possui tropismo pelo SNC. A principal manifestação clínica é a subaguda ou crônica. Ocorrendo em 5% dos casos lesões hematogênicas osteoarticulares e em 10% podem ser observadas lesões cutâneas, acometimento dos rins, supra-renais e próstata (Silva et al., 2003; Lazéra et al., 2004).

Em pacientes com AIDS as manifestações clínicas geralmente são, febre, cefaléia, mal-estar, vômitos, podendo apresentar lesões cutâneas em 7 a 8% dos pacientes, simulando *moluscum contagiosum* (Lacaz et al., 2002). Também podem apresentar dispnéia e náuseas, entretanto os sintomas pulmonares são decorrentes de outras manifestações clínicas, como a pneumonia. Um número pequeno de pacientes apresentam sintomas de meningite como, pescoço rígido, visão dupla e fotofobia. Usualmente sintomas orais, perda de peso e linfadenopatia difusa podem ocorrer. Apenas em 12 a 18% dos pacientes observa-se confusão mental e sonolência (Kown-Chun; Bennett, 1992).

É necessário estabelecer os estágios críticos da criptococose através da avaliação clínica em experimentos com animais de laboratório inoculados com o agente etiológico, bem como, as alterações teciduais e eficácia do tratamento. Esses modelos são importantes para caminhos positivos no trajeto de estudos *in vitro* até os pacientes (Graybill, 2000). As diferenças observadas na correlação entre diferentes estudos *in vitro* e *in vivo*, demonstram a necessidade da inclusão de metodologias padronizadas com a utilização de critérios interpretativos comuns, para o uso de drogas antifúngicas em doenças causadas por leveduras de interesse médico (Mukherjee et al., 2005).

2.7 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico laboratorial de *C. neoformans* consiste na demonstração desta levedura no material clínico, que pode ser feito a partir do LCR, urina, fragmentos de tecido, aspirados de lesões

cutâneas, escarro, lavado brônquico, sangue, secreção prostática e punção de medula óssea. Também é realizado o isolamento do fungo em cultura, sucedido por provas bioquímicas e pesquisa de antígenos circulantes (Menezes et al., 2002; Namiq et al., 2005; Chayakulkeeree; Perfect, 2006).

Quando o material a ser analisado é líquido, como o LCR e o escarro, são realizadas preparações com tinta da China ou com nigrosina. Porém, quando a pesquisa é realizada em tecidos, são utilizados corantes específicos como prata e mucicarmim (Lacaz et al., 2002). O diagnóstico é rápido e barato, quando se realiza o exame microscópico direto com tinta da China, pois permite a visualização de leveduras capsuladas. O fundamento desta técnica está relacionado com o fato de que a cápsula afasta as partículas da tinta, formando um halo claro em volta da mesma, tornando mais difícil a visualização de linhagens acapsuladas. Sendo eficiente em 80% dos casos de pacientes infectados com AIDS e em 50% dos casos de pacientes não-portadores de AIDS (Lazéra et al., 2004). Nos tecidos, a impregnação com prata pelo método de Gomori-Grocott é a mais utilizada, pois evidencia a parede celular das leveduras, apesar de não demonstrar a cápsula. A coloração com mucicarmim de Meyer, evidencia a cápsula em vermelho e é útil para diferenciar *C. neoformans* de outros fungos. Outra técnica utilizada é a coloração Fontana Masson, utilizada para demonstrar na parede da levedura o depósito de melanina, porém a hematoxilina-eosina pode ser utilizada para evidenciar a cápsula do fungo e para avaliar o padrão das lesões (Lacaz et al., 2002; Perfect; Casadevall, 2002; Lazéra et al., 2004; Pedroso; Candido, 2006; Consenso em Criptococose, 2008).

O exame comprobatório da espécie é a cultura, pois o cultivo do *Cryptococcus* em meio de cultura é simples, pela facilidade deste fungo se desenvolver em vários meios de cultura sem adição de ciclo-heximida, como Sabouraud, extrato de malte, sangue e infusão de cérebro-coração (BHI). Nesses meios o fungo cresce formando colônias mucóides de coloração creme, em 48 horas entre 25°C e 37°C, sendo a temperatura ideal 30°C, porém essa levedura possui uma tolerância térmica de até 40°C. Quando cultivadas em tubo, após cerca de um mês as colônias fluem da superfície (Fries et al., 1999; Fries et al., 2001; Fisher; Cook, 2001; Consenso em Criptococose, 2008).

Provas bioquímicas como a urease são utilizadas para identificação do gênero, diferenciando assim do gênero *Candida*, pois as espécies de *Cryptococcus* possuem a capacidade de hidrolisar a uréia em amônia, através da enzima urease, mudando a cor do indicador vermelho de fenol para um rosa escuro. As espécies podem ser diferenciadas com a adição de EDTA, pois desta forma ocorre uma inibição da urease em *C. gattii*, o que não é observado no *C. neoformans*. (Casadevall; Perfect, 1998; De Hoog et al., 2000; Cox et al., 2000; Casali et al., 2003). As espécies de *Cryptococcus* não são capazes de fermentar carboidratos, porém assimilam açúcares por metabolismo oxidativo, como glicose, maltose, sacarose e galactose (De Hoog et al., 2000). A habilidade de assimilar inositol

como única fonte de carbono é útil na diferenciação das espécies de *Rhodotorula* (Winn et al., 2008).

A prova da fenoloxidase é outra prova bioquímica importante para a diferenciação de *C. neoformans* das outras espécies do gênero e consiste na produção de um pigmento marrom (melanina), quando cultivadas em meios de cultura contendo substratos fenólicos (Carfachia et al., 2006; Pinto Junior et al., 2006; Capoor et al., 2007). Entretanto, há pesquisas que demonstram a produção de melanina por isolados de *C. albidus*, *C. laurentii* e *C. uniguttulatus*, porém de maneira menos pronunciada do que *C. neoformans* e *C. gattii* (Ikeda et al., 2002; Pedroso et al., 2009).

O meio L-CGB (L-canavanina, glicina e azul de bromotimol) separa bioquimicamente *C. neoformans* de *C. gattii*. Nesse meio, a espécie *C. neoformans* não cresce, pois é sensível à canavanina. Porém, *C. gatti* consegue se desenvolver, por ser resistente à canavanina e pela capacidade de utilizar a glicina como única fonte de carbono e nitrogênio, produzindo amônia e elevando o pH. Consequentemente ocorre uma mudança na coloração do meio para azul-cobalto, pela presença do azul de bromotimol (Nakamura et al., 1998; Khan et al., 2003).

Os polissacarídeos capsulares de *C. neoformans* e *C. gattii* se solubilizam nos fluidos corporais durante a infecção, podendo ser detectados e quantificados com anticorpos de coelho, anti-*Cryptococcus*. O teste sorológico mais comumente utilizado para detecção de antígeno é o da aglutinação em látex. Uma aglutinação positiva com título 1:4 sugere uma infecção por *Cryptococcus*, títulos ≥ 8 indicam doença em atividade, títulos 1:1.024 indicam alta carga fúngica, deficiência imunológica. Se persistir por mais de 2 semanas de tratamento (1:512) apontam uma dificuldade na resposta terapêutica (Mitchell; Perfect, 1995; Casadevall; Perfect, 1998; Consenso em Criptococose, 2008). O teste de ELISA também pode ser utilizado no diagnóstico imunológico, sendo útil tanto na detecção de antígenos, em títulos mais baixos e no início da infecção, como de anticorpos, que não são encontrados precocemente, mas podem ser detectados durante o tratamento e com a recuperação do paciente (Consenso em Criptococose, 2008).

Apesar de não ser utilizado no diagnóstico de rotina, atualmente existem técnicas moleculares, que em amostras clínicas ou em culturas detectam sequências gênicas específicas de *Cryptococcus* (Paschoal et al., 2004; Bovers et al., 2007). A reação em cadeia da polimerase (PCR) promoveu avanços no diagnóstico da criptococose, principalmente pela amplificação de regiões gênicas do rDNA, bem como genes para produção de cápsula (*CAP59*) e oritidina monofosfato pirofosforilase (*URA5*) (Paschoal et al., 2004; Rappelli et al., 1998; Bialek et al., 2002).

2.8 LECTINAS

Nos últimos anos, estudos vêm demonstrando a utilização de lectinas como reagentes úteis nas pesquisas sobre a superfície da célula fúngica, com perspectivas amplas de desempenhar também papel de valor na classificação desses microrganismos (Potts et al., 2001). No estudo do *C. neoformans*, agente da criptococose, o interesse está relacionado aos novos métodos de sorotipagem, que podem reconhecer as propriedades bioquímicas e antigênicas da cápsula polissacarídica do fungo, possibilitando a identificação correta de cada sorogrupo. Deste modo, marcadores biológicos não imunológicos podem ser usados para a identificação de sorotipos de *C. neoformans* e *C. gattii*. Dentre as várias classes de moléculas com essas características, as lectinas se sobressaem por possuírem a capacidade de reconhecer e se ligar especificamente, porém reversível, a resíduos de açúcares (Ambrosi et al., 2005; Komath et al., 2006).

As lectinas caracterizam um grupo heterogêneo de proteínas ou glicoproteínas ubíquas, observadas em várias espécies de vegetais, algas, animais e micro-organismos (Komath et al., 2006). Dependendo da origem, podem apresentar padrões distintos de ligação a carboidratos. Geralmente, as lectinas de algas possuem massa molecular menor que a maioria das lectinas de plantas e não demonstram afinidade por açúcares simples, ligando-se mais especificamente a oligossacarídeos, especialmente glicoproteínas.

Tanto as lectinas de origem animal quanto as de origem vegetais têm sido bastante utilizadas como ferramentas bioquímicas em pesquisas biotecnológicas e biomédicas (Lis; Sharon, 1998; Teixeira et al., 2007). Essas moléculas apresentam várias atividades biológicas e são utilizadas amplamente como marcadores celulares específicos, reconhecendo inclusive alterações nos padrões de expressão de glicoproteínas associadas à maturação celular e processos patológicos (Ambrosi et al., 2005).

A ligação lectina-carboidrato ocorre através de uma porção limitada da molécula protéica. É o segmento chamado de Domínio de Reconhecimento de Carboidrato ou CRD (*Carbohydrate-Recognition Domain*) que compreende um domínio globular com uma elevada conservação de resíduos de aminoácidos. Os carboidratos interagem com lectinas através de pontes de hidrogênio, devido o elevado número de hidroxilas nos açúcares disponíveis, que atuam como doadores ou receptores de hidrogênio. Também participam da interação lectina-carboidrato, interações hidrofóbicas e forças de Van Der Waals (Elgavish; Shannan, 1997; Loris et al., 1998; Santos, 2001).

2.9 MECANISMOS DE DEFESA DO SISTEMA IMUNOLÓGICO

Para que a criptococose se desenvolva, o fungo precisa sobreviver nos alvéolos pulmonares antes de se disseminar para outros tecidos, isso depende da interação efetiva do *Cryptococcus* com células epiteliais e macrófagos alveolares (Barbosa et al., 2006). Apesar desta levedura ter a expressão capsular reduzida ao infectar os alvéolos, em algumas horas a cápsula se torna compacta, com capacidade de interferir nos mecanismos de defesa do hospedeiro, protegendo da fagocitose e secretando o material presente na cápsula, modulando desta forma as atividades celulares. Caso o fungo consiga se estabelecer no pulmão, desenvolverá uma lesão, que poderá ser contida por granulomas (Barbosa et al., 2007).

A adesão a células epiteliais alveolares ocorre devido à ação de alguns componentes fúngicos, como adesinas, que permite a adesão e a penetração pelo tecido infectado; a fosfolipase B, que permite o acesso da levedura para o citoplasma dos macrófagos, devido a hidrólise dos componentes lipídicos da membrana; e a GXM, que dificulta a fagocitose, auxiliando na fuga do sistema imune (Feldmesser; Tucker; Casadevall, 2001; Bicanic; Harrison, 2005; Rodrigues et al., 2009).

Quando o mecanismo de fagocitose pelos macrófagos é eficiente, ocorre um englobamento das células fúngicas inaladas, evitando a exposição e a ação completa do sistema imunológico (Chang et al., 2006; Ma et al., 2006). Contudo, o *C. neoformans* é um patógeno tanto extracelular como intracelular, possuindo a capacidade de se desenvolver no interior dos macrófagos (Bicanic; Harrison, 2005), em algumas horas ocorre o acúmulo de GXM, com formação de vacúolos citoplasmáticos seguido do rompimento da célula hospedeira e liberação do patógeno para o meio extracelular, podendo infectar novas células (Feldmesser; Tucker; Casadevall, 2001; Del Poeta, 2004). Consequentemente pode-se observar resposta imune celular envolvendo o complexo CD14/TLR4, acarretando em uma maior expressão de moléculas, como FasL, CD40, CD86, CD14, TLR4, CD18 e FcγRII. Além da produção de IL-10 e redução da expressão de moléculas de MHC de classe II após a exposição do macrófago ao GXM. Esse polissacarídeo também possui a capacidade de interferir na produção de citocinas em macrófagos estimulados por lipopolissacarídeos (Monari et al., 2005a; Monari et al., 2005b).

Os macrófagos são muito importantes na defesa imunológica, porém podem causar dano ao tecido do hospedeiro ao liberar metabólitos tóxicos, além de poderem induzir a apoptose das células (Monari et al., 2005b). Contudo, uma das principais funções dos macrófagos é ativar células apresentadoras de antígenos (APC) e apresentar antígenos (Ags) em sua superfície para os linfócitos T. Os linfócitos T são ativados quando a APC expressa alguma molécula co-estimulatória, como por exemplo CD80 e CD86 (Villena et al, 2008).

Outro mecanismo de escape utilizado pelo *C. neoformans* é o processo de extrusão em alguns macrófagos, após a sua replicação no fagolisossomo. Os fungos são liberados sem causar dano para as células hospedeiras. Acredita-se que este mecanismo depende da presença de cápsula e que seja independente do funcionamento do citoesqueleto (Alvarez; Casadevall, 2006; Ma et al., 2006).

O fato deste fungo conseguir sobreviver no interior de fagócitos sem os levar à lise, pode influenciar na sua patologia. Um mecanismo de disseminação descrito recentemente foi a passagem lateral da levedura de uma célula infectada para outra não infectada, sem passar pelo espaço extracelular, evitando seu reconhecimento e ação da resposta imunológica, além de escapar de drogas que tenham penetração limitada nas células. Para que ocorra a passagem do patógeno entre as células é necessário que haja um contato entre elas e que seu citoesqueleto esteja funcionando normalmente, permitindo a motilidade das mesmas. Esse processo é de grande importância, pois permite a persistência intracelular do *C. neoformans*, além de possibilitar a disseminação do fungo pelo sistema circulatório e linfático, podendo interagir entre si e com outros tipos de células do hospedeiro. Acredita-se também que essa levedura pode através deste mecanismo atravessar a barreira hematoencefálica (Alvarez; Casadevall, 2006; Ma et al., 2006).

Outro tipo celular que auxilia na eliminação do *C. neoformans* são os neutrófilos. Contudo, a GXM diminui a atividade anti-criptocócica após ser internalizada por essas células (Monari et al., 2006), além de bloquear a interação dos neutrófilos com o endotélio. Essa ação inibe a migração dos leucócitos para os locais de combate ao fungo. Este bloqueio pode ser causado pela interação da GXM com selectinas e seus receptores de superfície no neutrófilo (Ellerbroek et al., 2004).

2.10 TRATAMENTO

A criptococose é uma doença considerada potencialmente fatal caso não seja estabelecida a terapia adequada. O tratamento é realizado através de diversos esquemas terapêuticos, mas apesar dos avanços ainda é considerado difícil, devido a toxicidade e teratogenicidade das drogas, além das interações medicamentosas. A terapêutica habitual da criptococose é feito com anfotericina B, associada ou não a outro antifúngico, como medicamentos da classe dos azólicos ou derivado pirimidínico 5-flucitosina. (Denning, 2003).

A anfotericina B é um antibiótico poliênico, foi descoberto na década de 50 a partir de culturas de *Streptomyces nodosus*. A administração dessa droga é realizada por via intravenosa, devido a sua baixa solubilidade que não permite a sua absorção gastrointestinal. Esse fármaco age aumentando a permeabilidade celular através da ligação ao ergosterol, componente essencial das

membranas biológicas dos fungos, responsável pela fluidez das mesmas. Após esta interação, ocorre a produção de poros ou canais, permitindo o extravasamento de íons e macromoléculas intracelulares, levando à morte da célula fúngica (Lemke, Kiderlen et al., 2005).

Apesar desta droga possuir alta afinidade pelo ergosterol, também possui a capacidade de se ligar ao colesterol e alguns constituintes da membrana celular humana, o que pode justificar a maioria dos efeitos tóxicos causados pelo uso da anfotericina B, como febre, dor de cabeça, náusea, vômitos, calafrios, tremores, alterações cardiovasculares, disfunção renal e efeitos tóxicos sobre a medula óssea (Pauw, 2000).

Anfotericina B encontra-se ligada as proteínas plasmáticas, cerca de 20 a 30% é removida do sangue no fígado e excretada com a bile nas fezes. Apresenta aproximadamente 2 a 5% na urina, biologicamente ativa, sem ser metabolizada. Possui extensa ligação aos tecidos e atravessa precariamente a barreira hematoencefálica, mas a penetração pode ser maior quando há inflamação nas meninges (Lemke, Kiderlen et al., 2005).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. CULTURAS

Foram utilizados 30 isolados de *Cryptococcus neoformans* obtidos da Micoteca URM do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

3.2. CARACTERIZAÇÃO DAS LEVEDURAS QUANTO A EXPRESSÃO DE CARBOIDRATOS NA PAREDE CELULAR – ENSAIO DE MARCAÇÃO COM LECTINAS.

3.2.1 Cepas de *Cryptococcus*

As trinta cepas de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* utilizados neste estudo foram obtidas de pacientes com diagnóstico de criptococose e tinham sido preservadas na URM Coleção de Culturas (Universidade Federal de Pernambuco/Brasil) desde 2008, como um material liofilizado e sob óleo mineral. As células de levedura foram inoculadas em frascos de Erlenmeyer de 100 ml contendo 50 ml de meio mínimo composto de dextrose (15 mM), MgSO₄ (10 mM), KH₂PO₄ (29,4 mM), glicina (13 mM), e tiamina-HCl (3 µM) (pH 5,5). As células fúngicas foram cultivadas durante 2 dias a 30 °C com agitação. As células de *Cryptococcus* foram obtidas por centrifugação, lavadas em solução tampão fosfato-salina (PBS), e contadas numa câmara de Newbauer para obter uma suspensão de 10⁷ células / ml, seguindo a metodologia de Rodrigues et al (2008).

3.2.2 Microscopia de Fluorescência

Para a leitura e interpretação do perfil de ligação das lectinas às paredes celulares de *Cryptococcus*, concanavalin A (Con A), wheat germ agglutinin (WGA), Ulex European agglutinin I (UEA -I) e peanut agglutinin (PNA), foram usadas conjugadas com fluoresceína. 1 ml da suspensão padrão de células de levedura em PBS foi centrifugada (2000 rpm) em eppendorfs 2mL durante 3 minutos para formar uma pellet. Depois disso, o conteúdo foi ressuspensão em tripsina (0,1%) durante 3 minutos a 37 °C e lavou-se novamente por centrifugação em PBS durante 3 minutos, seguido 2 vezes. Após esta etapa um conjugado de isotiocianato de fluoresceína com lectina (FITC-lectina) em uma concentração de 25 µg/ mL, foi adicionado a ressuspensão das células da levedura e incubados a 4 °C durante 1 hora, em seguida, a suspensão foi centrifugada e o pellet lavado com PBS. A avaliação do padrão de aglutinação de lectina foi realizada utilizando um microscópio de fluorescência (Zeiss AXIO Imager.M2m). Sendo avaliados os padrões de marcação como intenso, moderado ou fraco.

3.2.3. Alvos de WGA em *C. neoformans*

Durante a preparação para a avaliação da ligação da lectina WGA uma etapa adicional usando um pré-tratamento enzimático com neuraminidase (em ordem a evitar a ligação inespecífica aos resíduos de ácido siálico) foi adicionada. Para este efeito, 100 µl de neuraminidase foram adicionados à suspensão de levedura durante 1 hora a 37 °C antes da adição da lectina.

3.3. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

As leveduras cresceram em Sabouraud dextrose líquido (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) por 24h a 30°C em agitação, com rotação de 150 rpm.

As células de *C. neoformans* foram coletadas por centrifugação, lavadas duas vezes com tampão fosfato salina (PBS), contadas com o auxílio de um hemacitômetro, e suspensas a 10^7 cels/ml em meio mínimo (20 mg de tiamina/ ml, 30 mM glicose, 26 mM glicina, 20 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 58.8 mM KH_2PO_4). Em seguida, 100µl da suspensão foram adicionadas em placas de poliestireno com 96 poços (Fisher, Massachusetts) e incubadas a 37°C sem agitação. Biofilmes foram formados por 48 h. Após o estágio de adesão, os poços contendo biofilmes de *C. neoformans* foram lavados três vezes com água Milli-Q para remoção das células criptocócicas não aderidas. As células fúngicas que permaneceram aderidas a superfície plástica foram consideradas biofilmes verdadeiros seguindo a metodologia de Martinez e Casadevall (2006). Em seguida, os biofilmes foram corados com cristal violeta e observados visualmente.

3.4. ANÁLISE *IN VIVO* DA VIRULÊNCIA DE *Cryptococcus neoformans*

3.4.1. Animais e protocolo de imunossupressão

Foram obtidos camundongos suíços, machos e adultos, pesando em média 30 gramas, a partir do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Azami (LIKA-UFPE). Os animais foram manipulados de acordo com os procedimentos experimentais após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do Centro de Ciências Biológicas da UFPE. Os animais receberam 0,5 mg de dexametasona TEUTO® Brazil por via intraperitoneal por 7 dias consecutivos. Para fins de comprovação da imunossupressão, foi realizado leucograma dos animais imunossuprimidos (IS), n=24/ 2 grupos em comparação com o grupo controle, os animais imunocompetentes (IC), n=12.

3.4.2. Modelo de infecção por *Cryptococcus neoformans*

Após a imunossupressão, os animais IS (n= 12) forão inoculados pela veia caudal com 0,2 mL da suspensão de um isolado de *C. neoformans* (10^6 células / ml), caracterizado quanto à capacidade

de formar biofilme. E os outros camundongos IS (n = 6/ 2 grupos) foram inoculados com PBS nas mesmas condições experimentais. Os sinais clínicos foram observados diariamente, bem como a mortalidade, até um total de 7 dias de experimento.

3.4.3. Tratamento da criptococose disseminada com anfotericina B

Sete dias após a infecção, 0,5 mg/ kg de anfotericina B foi administrado diariamente pela veia caudal dos animais IS e infectados, durante 7 dias. O grupo controle continuou recebendo apenas PBS. Os animais foram observados quanto aos sinais clínicos e mortalidade diariamente até no final do 7º dia do experimento.

3.4.4. Quantificação de *Cryptococcus neoformans* e exame histológico

Uma alíquota de sangue foi recolhida por punção cardíaca após a eutanásia com halotano. O baço, fígado, rins, pulmões e cérebro foram pesados e macerados em PBS (1:10 ou 1:100, w/v). Todas as amostras foram submetidas a diluições sucessivas e 0,1 mL foi adicionado a placas contendo Sabouraud Dextrose Agar (SDA) adicionado com cloranfenicol (50 mg / mL) e incubadas a 37°C durante 24-72 h. Os dados foram apresentados como unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de tecido ou por mL de sangue. Partes dos tecidos foram fixados em formalina a 10% e processados para inclusão em parafina para os procedimentos histológicos. Cortes de 5 mm foram corados com hematoxilina-eosina e as lâminas codificadas e examinados por um patologista de referência.

4. VISANDO A PAREDE CELULAR DE *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* USANDO LECTINAS: ESTUDO DO DOMÍNIO DE LIGAÇÃO AOS CARBOIDRATOS

4.1. RESUMO

Cryptococcus neoformans var. *grubii* é considerado a principal causa de criptococose em pacientes imunossuprimidos. Entender as glicoproteínas da parede celular usando lectinas é de interesse médico e pode contribuir para a terapia específica. O objetivo deste estudo foi avaliar os carboidratos na parede celular de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, utilizando um protocolo de ligação à isotiocianato-lectina de fluoresceína. Trinta cepas de levedura estocadas na coleção de cultura foram cultivadas durante 2 dias a 30 °C com agitação. As células foram obtidas por centrifugação, lavadas em solução salina tamponada com fosfato e foi obtida uma suspensão de 10^7 células/mL. Para determinar o perfil de ligação das lectinas, utilizaram-se concanavalina A (Con A), aglutinina de germe de trigo (WGA), aglutinina *Ulex europaeus* I (UEA-I) e aglutinina de amendoim (PNA) conjugada com fluoresceína. Todos os isolados clínicos testados de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* foram intensamente corados por WGA, moderadamente coradas por Con A, e fracamente coradas por PNA e UEA-I. Assim, o *Cryptococcus* pode ser detectado em amostras clínicas como sangue e líquido cefalorraquidiano utilizando a lectina fluorescente WGA, o que pode ser considerado como uma opção para detecção em casos de suspeita de criptococose com baixa sensibilidade laboratorial. Futuras aplicações podem ser desenvolvidas usando esta ferramenta básica.

Palavras chaves: Lectinas. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. Carboidratos da parede celular. Diagnóstico.

4.2. INTRODUÇÃO

Nos países desenvolvidos, *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* é considerado a principal causa de criptococose, uma infecção humana grave que resulta em morte em alguns casos [1-3]. Os mecanismos que estão envolvidos na sua patogênese podem ser estudados melhor começando com uma compreensão das glicoproteínas da parede celular, que são características importantes para fungos de interesse médico [4]. Neste contexto, diferentes lectinas foram utilizadas para determinar um padrão de glicoconjugados celulares em espécies de *Cryptococcus*, incluindo *C. neoformans* var. *grubii* [5,6].

¹Trabalho publicado como De Brito Ximenes, Pamella; Macêdo, Danielle; Buonafina, Maria; De Lima-Neto, Reginaldo; Neves, Rejane, 2014. Visando a parede celular de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* usando lectinas: estudo do domínio de ligação aos carboidratos. *Molecules*.

As lectinas são uma classe de proteínas que exibem enorme potencial biológico e farmacológico; as lectinas foram originalmente identificadas em plantas, animais e espécies de micróbios [7]. Estas proteínas têm pelo menos um domínio não catalítico que se liga especificamente e reversivelmente a mono- ou oligossacarídeos [8]. Esta capacidade de reconhecimento de carboidratos permite interações com glicoconjugados de superfície de membrana celular, consequentemente interferindo em vários eventos biológicos tais como infecção, diferenciação celular, interação patógeno-hospedeiro, metástase e reconhecimento celular [9-11].

Vários estudos têm consistentemente demonstrado que o conhecimento dos componentes superficiais de *C. neoformans* é essencial para a compreensão da patogênese da criptococose [5]. É importante considerar que a interação entre a parede celular da levedura e receptores do tecido hospedeiro permite o primeiro passo no estabelecimento da doença, a adesão [8]. Assim, o direcionamento de glicoconjugados da parede celular tais como N-acetil-D-glucosamina, L-fucose, D-galactose e glicose/manose podem elucidar muitos papéis biológicos e patológicos que são atualmente pouco claros. A expressão de N-acetil-D-glucosamina pode ser analisada utilizando a aglutinina de germe de trigo (WGA), a metil- α -D-manosíde utilizando concanavalina A (Con A), a L- fucose utilizando aglutinina I de *Ulex europaeus* (UEA- I) e para a detecção de D-galactose e glicose/manose na superfície da parede celular, a aglutinina de amendoim (PNA) é considerada a lectina mais específica [5].

Os métodos de detecção convencionais para espécies de *Cryptococcus* incluem isolamento de cultura, morfologia de colônia e características nutricionais. Este fungo pode demorar 24-72 h ou mesmo semanas para crescer na cultura primária. Por esta razão, o diagnóstico de criptococose no nível de espécies fúngicas é demorado e atrasa o tratamento de escolha. Além disso, esses métodos são trabalhosos e podem eventualmente fornecer identificações inconclusivas [9].

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de N-acetil-D-glucosamina, metil- α -D-manósíde, L-fucose, D-galactose e glicose/manose na superfície da parede celular de *C. neoformans* var. *grubii* através de protocolos de coloração utilizando aglutinina de germe de trigo (WGA), concanavalina A (Con A), aglutinina *Ulex europaeus* I (UEA-I) e lectinas de aglutinina de amendoim (PNA).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios de ligação à lectina utilizando WGA, Con A, UEA-I e PNA mostraram três padrões de fluorescência específicos de carboidratos para o *C. neoformans* var. *grubii* como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Cepas de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* e padrões de fluorescência de coloração com lectina

<i>Cryptococcus neoformans var. grubii</i>	lectina WGA	lectina Con A	lectina PNA	lectina UEA-I
*URM				
5809	+++	++	+	+
5810	+++	++	+	+
5811	+++	++	+	+
5813	+++	++	+	+
5814	+++	++	+	+
5815	+++	++	+	+
5816	+++	++	+	+
5818	+++	++	+	+
5819	+++	++	+	+
5820	+++	++	+	+
5821	+++	++	+	+
5822	+++	++	+	+
5823	+++	++	+	+
5824	+++	++	+	+
5825	+++	++	+	+
6895	+++	++	+	+
6896	+++	++	+	+
6897	+++	++	+	+
6898	+++	++	+	+
6899	+++	++	+	+
6900	+++	++	+	+
6901	+++	++	+	+
6902	+++	++	+	+
6903	+++	++	+	+
6904	+++	++	+	+
6905	+++	++	+	+
6906	+++	++	+	+
6907	+++	++	+	+
6908	+++	++	+	+
6909	+++	++	+	+

Notas: As cepas foram obtidas da Coleção de Culturas Universidade Recife Micologia (URM), Pernambuco/ Brasil; WGA: aglutinina de germe de trigo; Con A: concanavalina A; PNA: aglutinina de amendoim; UEA-I: aglutinina Ulex europaeus I; +++: padrão de coloração intensa; ++: padrão de coloração moderado; +: padrão de coloração fraco.

Os ensaios foram realizados em duplicado, e os duplicados exibiram os mesmos padrões de coloração. Os padrões foram intensos, moderados e fracos, respectivamente (Figura 1).

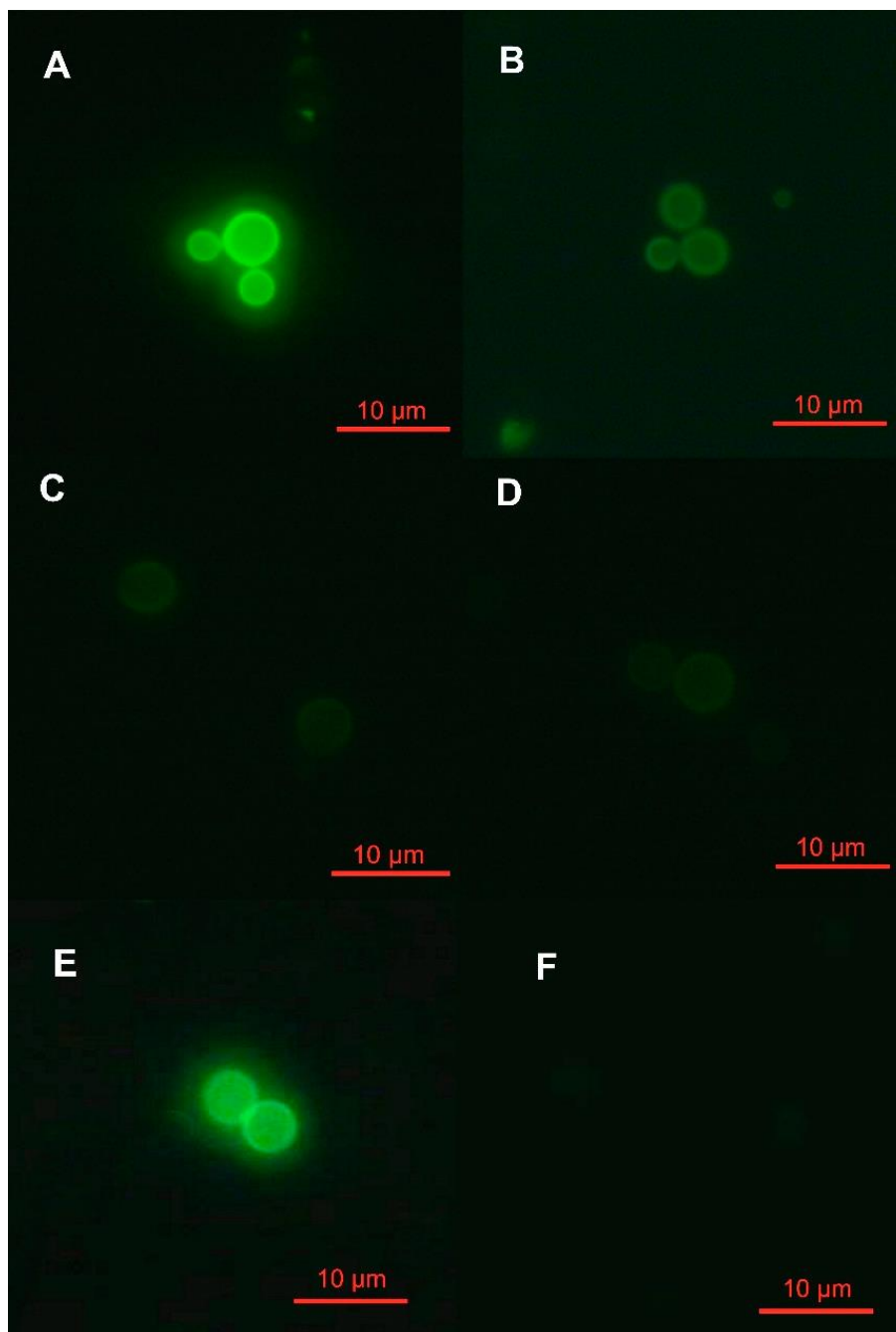


Figura 1. Padrões de fluorescência de coloração de lectina a partir de isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. A coloração foi intensa (A) com aglutinina de gérmen de trigo (WGA), moderada (B) com concanavalina A (Con A) e fraca (C, D) com aglutinina de amendoim (PNA) e aglutinina Ulex europaeus I (UEA-I). Controles positivos (E) e negativos (F) dos padrões de fluorescência.

Todas as cepas testadas de *C. neoformans* var. *grubii* tinha coloração intensa com WGA, coloração moderada com Con A e coloração fraca com PNA e UEA-I quando comparado com os controles positivos e negativos. Estes dados sugerem que a N-acetil-D-glucosamina foi altamente expressa na superfície da parede celular das cepas de *Cryptococcus* testadas porque este carbonoidrato é a molécula alvo de WGA. Em contraste, a expressão moderada e fraca de metil-a-D-manósido e D-galactose / L-fucose foram visualizadas por coloração Con A e PNA / UEA-I, respectivamente.

De acordo com Fonseca et al. [10], a associação íntima de paredes celulares criptocócicas com uma cápsula envolvente distintiva dificulta o isolamento e a purificação dos constituintes da parede celular, comprometendo nossa compreensão da composição, estrutura e bioquímica associada a parede celular criptocócica. Por conseguinte, a análise da composição da parede celular utilizando padrões fluorescentes de coloração com lectina pode facilitar o conhecimento e a percepção destas moléculas *in situ*.

Estudos anteriores indicaram que uma parede de fungos típica de basidiomiceto (tal como verificada em espécies de *Cryptococcus*) compreende predominantemente N-acetilglucosamina na forma de microfibrilas de quitina com glicoproteínas semelhantes a gel, muitas delas de manose [11]. A cápsula *Cryptococcus* é predominantemente composta de manose e tem sido mostrado para suscitar e modular respostas imunes em seres humanos [12,13]. A manose capsular mais comum em *Cryptococcus* é o polissacarídeo glucuronoxilomanana, que forma até 88 % do material capsular [13].

A imagem do isotiocianato de fluoresceína (FITC) -WGA (Figura 1A), FITC-Con A (Figura 1B), FITC-PNA (Figura 1C) e FITC-UEA-I (Figura 1D) na superfície celular por microscopia de fluorescência demonstraram três diferentes padrões de coloração: intenso, moderado e fraco. Com base nos resultados apresentados na Tabela 1, a marcada fluorescência a partir de 30 cepas de *C. neoformans* var. *grubii* expostas a FITC-WGA indica uma elevada concentração de N-acetil-D-glucosamina na superfície celular. Em contraste, a fluorescência moderada foi detectada com FITC-Con A em todas as cepas testadas. De acordo com Foster et al. [13], Con A liga-se principalmente aos resíduos de manose. Adicionalmente, foi observado um fraco padrão fluorescente em todas as cepas testadas quando exposto a FITC-PNA e FITC-UEA-I.

Fonseca et al. [10] afirmam que a abundância de um determinado carboidrato na parede celular de *C. neoformans* está relacionada com a cepa e a fase de crescimento. Alguns autores sugerem que a natureza da exposição FITC-WGA e FITC-Con A parece ser uma característica definidora de *Cryptococcus* [13]. FITC-PNA e FITC-UEA-I exibiram os mesmos resultados em relação à intensidade de fluorescência. Estudos futuros de *C. neoformans* var. *grubii* de composição

de carboidrato da parede celular pode selecionar entre FITC-PNA e FITC-UEA-I porque os padrões de coloração eram semelhantes.

Assim, a detecção desta espécie em espécimes clínicos como sangue e líquido cefalorraquidiano utilizando a lectina fluorescente WGA pode ser considerada uma opção para análises laboratoriais, especialmente em casos de suspeita de meningite ou em pacientes imunossuprimidos com resposta sorológica deficiente. Esta base técnica também pode ser usada com citometria de fluxo para obter um diagnóstico rápido e confiável com caracterização das espécies envolvidas.

4.4. SEÇÃO EXPERIMENTAL

4.4.1. Cepas de *Cryptococcus* e condições de crescimento

Os 30 *C. neoformans* var. *grubii* utilizados neste estudo foram obtidas de pacientes com diagnóstico de criptococose e foram preservadas na coleção de culturas Universidade Recife Micologia (Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE) desde 2008 como material liofilizado e sob óleo mineral. Inicialmente, as células de levedura foram inoculadas em frascos de Erlenmeyer de 100 mL contendo 50 mL de meio mínimo composto de dextrose 15 mM, MgSO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 29,4 mM, glicina 13 mM, e 3 mM de tiamina-HCl, pH 5,5. As células fúngicas foram cultivadas durante 2 dias a 30 °C com agitação. As células criptocócicas foram recolhidas por centrifugação, lavadas em tampão fosfato salina (PBS) e contadas numa câmara de Neubauer para obter uma suspensão padrão de 10⁷ células/mL seguindo o método de Rodrigues et al. [9].

4.4.2. Ligação de lectina à parede celular criptocócica

O perfil de ligação das lectinas à parede celular criptocócica foi verificado através do uso de Con A, WGA, UEA-I e PNA conjugado com FITC. Primeiro, 1 mL da suspensão padrão previamente obtida das células de levedura em PBS foi centrifugado a 470 g em tubos de microcentrífuga durante 3 min. Após este passo, o sedimento foi suspenso em tripsina a 0,1% durante 3 min a 37 °C e lavado novamente por centrifugação em PBS. Este procedimento foi repetido duas vezes. Após este passo, as lectinas ConA, WGA, UEA e PNA de 25 µg/mL conjugadas com FITC (lectina FITC) foram adicionadas separadamente às células de levedura obtidas após lavagens sequenciais para incubação a 4 °C durante 1 h. A preparação foi centrifugada e o sedimento foi lavado com PBS para avaliar os padrões de especificidade de lectina utilizando um microscópio de fluorescência (AXIO Imager M2m, Zeiss, Calgary, AB, Canadá). Os perfis de ligação foram expressos de acordo com a intensidade de fluorescência como se segue: intenso, +++; moderado, ++; e fraco, +. Todos os procedimentos foram repetidos duas vezes.

Particularmente para a utilização da lectina WGA, foi desenvolvida uma etapa adicional para preparar amostras para avaliação da ligação. Este passo envolveu um pré-tratamento enzimático com neuraminidase para prevenir ligação não específica a ácidos siálicos. Especificamente, adicionou-se 100 uL de neuraminidase (Sigma, St. Louis, MO, EUA) à suspensão de levedura após as lavagens e incubou-se durante 1 h a 37 °C antes da adição da lectina de acordo com os passos descritos anteriormente.

4.5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA, Recife, PE, Brasil) pelo uso do laboratório de microscopia eletrônica. Também agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil) pelo apoio financeiro.

4.6. CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

P.B.X. realizou os experimentos. M.D.S.B. e R.G.L.-N. deram suporte no laboratório. E.I.C.B. e R.P.N. analisaram os dados. R.P.N. e D.P.C.M. escreveram e editaram o manuscrito.

4.7. CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

4.8. REFERÊNCIAS

1. Liu, T.B.; Perlin, D.; Xue, C. Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. *Virulence* **2012**, *3*, 173–181.
2. Vu, K.; Eigenheer, R.A.; Phinney, B.S.; Gelli, A. *Cryptococcus neoformans* promotes its transmigration into the central nervous system by inducing molecular and cellular changes in brain endothelial cells. *Infect. Immun.* **2013**, *81*, 3139–3147.
3. Santi, L.; Beys-da-Silva, W.O.; Berger, M.; Calzolari, D.; Guimarães, J.A.; Moresco, J.J.; Yates, J.R. Proteomic profile of *Cryptococcus neoformans* biofilm reveals changes in metabolic processes. *J. Proteome Res.* **2014**, *13*, 1545–1559.
4. Leal, A.F.G.; Lima-Neto, R.G.; Macêdo, D.P.C.; Beltrão, E.I.C.; Neves, R.P. Carbohydrate profile of fungal cell wall surface glycoconjugates of *Trichophyton tonsurans* and other keratinophilic filamentous fungi using lectins. *Mycoses* **2011**, *54*, 789–794.
5. Patil, R.T.; Sangwan, J.; Juya, D.; Lathwa, S. Meningitis due to *Cryptococcus gattii* in an immunocompetent patient. *J. Clin. Diagn. Res.* **2013**, *7*, 2274–2275.
6. Seco-Rovira, V.; Beltrán-Frutos, E.; Ferrer, C.; Sánchez-Huertas, M.M.; Madrid, J.F.; Saez, F.J.; Pastor, L.M. Lectin histochemistry as a tool to identify apoptotic cells in the seminiferous

- epithelium of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) subjected to short photoperiod. *Reprod. Domest. Anim.* **2013**, 48, 974–983.
7. Rodríguez-Cerdeira, C.; Arenas, R.; Moreno-Coutiño, G.; Vásquez, E.; Fernández, R.; Chang, P. Micosis sistémicas en pacientes con virus de la inmunodeficiencia humana/SIDA. *Actas Dermosifiliogr.* **2014**, 105, 5–17.
 8. Lima-Neto, R.G.; Beltrão, E.I.; Oliveira, P.C.; Neves, R.P. Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. *Mycoses* **2011**, 54, 23–29.
 9. Rodrigues, M.L.; Alvarez, M.; Fonseca, F.L.; Casadevall, A. Binding of the wheat germ lectin to *Cryptococcus neoformans* suggests an association of chitinlike structures with yeast budding and capsular glucuronoxylomannan. *Eukaryot. Cell* **2008**, 7, 602–609.
 10. Fonseca, F.L.; Guimarães, A.J.; Kmetzsch, L.; Dutra, F.F.; Silva, F.D.; Taborda, C.P.; Araujo, G.S.; Frases, S.; Staats, C.C.; Bozza, M.T.; *et al.* Binding of the wheat germ lectin to *Cryptococcus neoformans* chito oligomers affects multiple mechanisms required for fungal pathogenesis. *Fungal Genet. Biol.* **2013**, 60, 64–73.
 11. Gooday, G.W. Cell walls. In *The Growing Fungus*; Gow, N.A.R., Gadd, G.M., Eds.; Chapman Hall: London, UK, 1995; pp. 43–62.
 12. Pietrella, D.; Cherniak, D.; Strappani, C.; Perito, S.; Mosci, P.; Bistoni, F.; Vecchiarelli, A. Role of mannoprotein in induction and regulation of immunity to *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* **2001**, 69, 2808–2814.
 13. Foster, A.J.; Bird, R.A.; Kelly, S.L.; Nishimura, K.; Poyner, D.; Taylor, S.; Smith, S.N. FITC-lectin avidity of *Cryptococcus neoformans* cell wall and capsular components. *Mycologia* **2004**, 96, 1–8.

5. FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Cryptococcus neoformans*: AVALIAÇÃO EM MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO* E ASSOCIAÇÃO COM A RESISTÊNCIA TERAPÊUTICA¹

5.1. RESUMO

Cryptococcus neoformans é uma levedura caracterizada por possuir uma cápsula mucopolissacarídica, sendo responsável por causar uma micose sistêmica, a criptococose e por acometer normalmente indivíduos imunocomprometidos. Esse fungo possui várias características que aumentam a sua patogenicidade, dentre elas a capacidade de formar biofilme, que auxilia no estabelecimento de infecção fúngica e pode ser responsável por aumentar a resistência do patógeno a terapia medicamentosa e aos mecanismos do sistema imunológico do hospedeiro. Neste estudo, avaliamos isolados de *Cryptococcus neoformans*, obtidos de pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), quanto a capacidade de formar biofilme “*in vitro*” e demonstramos o efeito desta característica em modelo experimental “*in vivo*”. Para formação do biofilme foi utilizado meio mínimo para o crescimento do fungo e os resultados foram avaliados visualmente após 48 h. A criptococose experimental foi reproduzida através da imunossupressão com dexametasona, a infecção foi realizada com uma cepa capaz de produzir biofilme, segundo perfil *in vitro* e o tratamento com anfotericina B. Ao final do experimento, foi verificado que todos os isolados possuíam a capacidade de formação de biofilme e que o isolado de *Cryptococcus neoformans* URM 6902, apresentou alta patogenicidade em camundongos imunossuprimidos, sendo resistente ao tratamento com anfotericina B. Desta forma, demonstramos que o biofilme é um fator de virulência bastante significativo para o estabelecimento da criptococose, conferindo uma maior resistência do patógeno à terapia antifúngica.

Palavras chaves: *Cryptococcus neoformans*, biofilme, criptococose.

5.2. INTRODUÇÃO

Cryptococcus neoformans é uma levedura caracterizada por possuir uma cápsula mucopolissacarídica, sendo responsável por causar uma micose sistêmica, a criptococose e por acometer normalmente indivíduos imunocomprometidos, devido a infecção pelo HIV, transplantes de órgãos, uso de medicamentos imunossupressores, câncer, diabetes mellitus, dentre outros distúrbios (Chuang et al., 2010).

² Trabalho a ser submetido para publicação como Ximenes, P.B., Pereira Junior, S.F., Buonafina, M.D.S., Macêdo, D.P.C., Neves, R.P. 2014. Formação de biofilme por *Cryptococcus neoformans*: avaliação em modelo experimental *in vivo* e associação com a resistência terapêutica. *Mycoses*.

As formas mais comuns da infecção são a pneumonia, pela inalação de propágulos infectantes, provavelmente por células de leveduras e/ou pequenos basidiosporos, que se depositam facilmente nos alvéolos pulmonares, considerada a primo-infecção; e a meningite, quando não controlada no pulmão, pois o *Cryptococcus* possui um tropismo pelo sistema nervoso central, podendo generalizar e levar o paciente a óbito (Martinez et al., 2008).

Esse fungo possui várias características que aumentam a sua patogenicidade, dentre elas a capacidade de formar biofilme, através da adesão a superfícies, inertes ou vivas, e de organização em comunidades microbianas com metabolismo particular, circundado por uma matriz extracelular (Gognies, Belarbi, 2010; Martinez et al., 2010).

Vários micro-organismos possuem a capacidade de produzir essa estrutura, como estratégia para sobreviver em lugares hostis, conferindo proteção a fatores ambientais. Sendo assim, essa característica aumenta a virulência dentro do hospedeiro humano. O biofilme criptocócico auxilia no estabelecimento de infecção fúngica e pode ser responsável por aumentar a resistência do patógeno a terapia medicamentosa e aos mecanismos do sistema imunológico do hospedeiro (Martinez, Casadevall, 2006).

Neste estudo, avaliamos isolados de *Cryptococcus neoformans*, obtidos de pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), quanto a capacidade de formar biofilme “in vitro” e demonstramos o efeito desta característica em modelo experimental “in vivo”.

5.3. MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1. Avaliação da capacidade de formação de biofilme

As leveduras cresceram em Sabouraud dextrose líquido (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) por 24h a 30°C em agitação, com rotação de 150 rpm.

As células de *C. neoformans* foram coletadas por centrifugação, lavadas duas vezes com tampão fosfato salina (PBS), contadas com o auxílio de uma câmara de Neubauer, e suspensas a 10^7 cels/mL em meio mínimo (20 mg de tiamina/ ml, 30 mM glicose, 26 mM glicine, 20 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 58.8 mM KH_2PO_4). Em seguida, 100µl da suspensão foram adicionadas em placas de poliestireno com 96 poços (Fisher, Massachusetts) e incubadas a 37°C sem agitação. Biofilmes foram formados por 48 h. Após o estágio de adesão, os poços contendo biofilmes de *C. neoformans* foram lavados três vezes com água Milli-Q para remoção das células criptocócicas não aderidas. As células fúngicas que permaneceram aderidas a superfície plástica foram consideradas biofilmes verdadeiros seguindo a metodologia de Martinez e Casadevall (2006). Em seguida, os biofilmes foram corados com cristal violeta e observados visualmente.

5.3.2. Análise *in vivo* da virulência de *Cryptococcus neoformans*

5.3.2.1. Animais e protocolo de imunossupressão

Foram obtidos camundongos suíços, machos e adultos, pesando em média 30 gramas, a partir do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Azami (LIKA-UFPE). Os animais foram manipulados de acordo com os procedimentos experimentais após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do Centro de Ciências Biológicas da UFPE. Os animais receberam 0,5 mg de dexametasona TEUTO® Brazil por via intraperitoneal por 7 dias consecutivos. Para fins de comprovação da imunossupressão, foi realizado leucograma dos animais imunossuprimidos (IS), n=24/ 2 grupos em comparação com o grupo controle, os animais imunocompetentes (IC), n=12.

5.3.2.2. Modelo de infecção por *Cryptococcus neoformans*

Após a imunossupressão, os animais IS (n= 12) foram inoculados pela veia caudal com 0,2 mL da suspensão de um isolado de *C. neoformans* (10^6 células/mL), caracterizado quanto à capacidade de formar biofilme. E os outros camundongos IS (n = 6/ 2 grupos) foram inoculados com PBS nas mesmas condições experimentais. Os sinais clínicos foram observados diariamente, bem como a mortalidade, até um total de 7 dias de experimento.

5.3.2.3. Tratamento da criptococose disseminada com anfotericina B

Sete dias após a infecção, 0,5 mg/ kg de anfotericina B foi administrado diariamente pela veia caudal dos animais IS e infectados, durante 7 dias. O grupo controle continuou recebendo apenas PBS. Os animais foram observados quanto aos sinais clínicos e mortalidade diariamente até no final do 7º dia do experimento.

5.3.2.4. Quantificação de *Cryptococcus neoformans*

Uma alíquota de sangue foi recolhida por punção cardíaca após a eutanásia. O baço, fígado, rins, pulmões e cérebro foram pesados e macerados em PBS (1:10 ou 1:100, w/v). Todas as amostras foram submetidas a diluições sucessivas e 0,1 mL foi adicionado a placas contendo Sabouraud Dextrose Agar (SDA) adicionado com cloranfenicol (50 mg/mL) e incubadas a 37 °C durante 24-72 h. Os dados foram apresentados como unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de tecido ou por mL de sangue.

5.4. RESULTADOS

5.4.1. Avaliação da capacidade de formação de biofilme

As células fúngicas que permaneceram fixadas à superfície do poço foram consideradas biofilmes verdadeiros. Ao final do experimento, foi verificado que todos os isolados possuíram a capacidade de formação de biofilme, como pode ser observado na Fig. 1.

5.4.2. Protocolo de imunossupressão

Após os 7 dias de infecção, os animais dos grupos (IS), apresentaram em média 40% a menos de leucócitos totais em comparação ao grupo de animais (IC).

5.4.3. Modelo de infecção por *Cryptococcus neoformans*

O isolado selecionado de *Cryptococcus neoformans* URM 6902, foi capaz de infectar os animais (Grupo IS/ n= 12 animais), desenvolvendo uma micose disseminada pelo cérebro, baço, rins, pulmões e fígado (Fig. 2).

5.4.4. Tratamento da criptococose disseminada com anfotericina B

O tratamento com anfotericina B não se mostrou eficiente para o controle da infecção, pois o fungo se apresentou bastante resistente a terapia, ocorrendo a morte de 5 animais antes do término do tratamento.

5.4.5. Quantificação de *Cryptococcus neoformans*

Ao final dos 7 dias de tratamento, os animais ainda permaneceram infectados. Depois do sacrifício e semeio dos órgãos diluídos (1/10 – 1/100), foi observado após 72 h de incubação a presença da levedura em todos os órgãos, através de UFC (Tab. 1).

5.5. DISCUSSÃO

Neste estudo, reproduzimos um modelo experimental seguro de criptococose, para avaliar os efeitos causados pela infecção com um isolado de *Cryptococcus neoformans* capaz de produzir biofilme. Vários trabalhos demonstram “in vitro” a habilidade de espécies de *Cryptococcus* em desenvolver esta estrutura, contudo essa relação “in vivo” ainda não havia sido demonstrada.

Segundo Ravi e colaboradores (2009), essa levedura precisa se adaptar as condições ambientais para sobreviver, tanto no seu habitat natural, quanto no interior de mamíferos. Sendo o biofilme uma ferramenta de proteção deste patógeno. Eles avaliaram se a produção de biofilme ocorre de forma similar na natureza e “in vivo” no mamífero. Observaram que há esta semelhança e que o biofilme pode servir como um nicho, que protege e garante a sobrevivência do *Cryptococcus*.

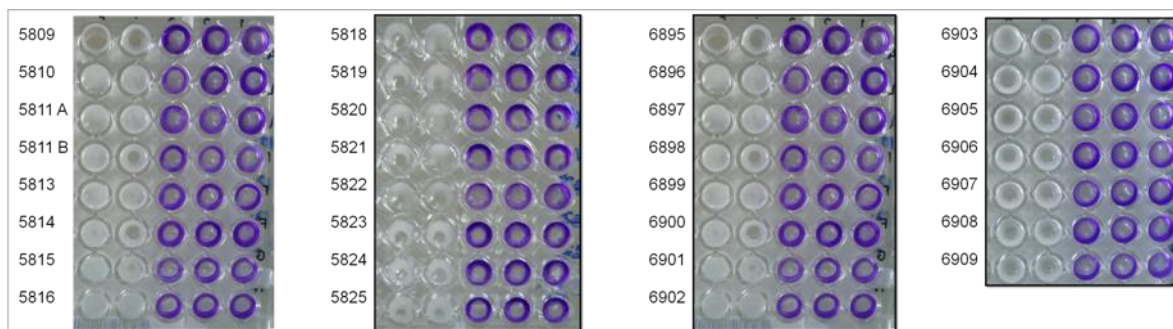
As características fenotípicas das colônias de *Cryptococcus neoformans* foram avaliadas por Martinez e colaboradores (2008), observando que as cepas lisas produziram biofilmes mais resistentes do que as de características muicóides ou enrugadas. Contudo, as colônias de *C. neoformans* podem sofrer mudança fenotípica “in vitro” para tipos de colônias, que diferem na sua virulência em camundongos. As variações no fenótipo influenciaram no nível de adesão e produção de biofilme, podendo ser um elemento crítico para a produção dessa estrutura.

As pesquisas relacionadas a ação do sistema imunológico e de fármacos antimicrobianos frente ao biofilme criptocócico ainda é escasso, Martinez e Casadevall (2006) avaliaram a ação oxidativa pelo hipoclorito, observando diminuição de células planctônicas em 60%, porém esta substância não foi capaz de afetar de forma significativa o biofilme formado por *Cryptococcus*. Também demonstraram a eficácia reduzida de moléculas produzidas pelo sistema imune, que provavelmente está relacionada a matriz polimérica, que dificulta a interação de células fagocíticas com células fúngicas do biofilme, propiciando o estabelecimento da levedura e de uma infecção persistente.

Um agente antimicrobiano utilizado para a profilaxia ou tratamento de dispositivos médicos relacionado a biofilme fúngicos foi sugerido por Martinez e colaboradores (2010), o quitosano. Essa substância reduziu significativamente a atividade metabólica e impediu a aderência das células fúngicas para a superfície de poliestireno, diminuindo a sobrevivência dos biofilmes de *C. neoformans*.

Todos os trabalhos desenvolvidos com relação ao potencial de formação de biofilme corroboram com os resultados obtidos na nossa pesquisa, acarretando em um aumento da patogenicidade dos isolados de *Cryptococcus neoformans* e em uma resistência elevada ao tratamento antifúngico.

Fig. 1: Formação de biofilme por isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* mantidos na coleção de cultura URM.



6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

- As lectinas possuem a capacidade de se ligar especificamente aos carboidratos da superfície celular, podendo desta forma auxiliar na identificação das variedades de *Cryptococcus*.
- A lectina *Wheat germ agglutinin* (WGA), apresenta o padrão de marcação intenso, devido a sua capacidade de se ligar ao N-acetil-D-glucosamina presente no fungo.
- A lectina *concanavalin A* (Con A), demonstrou uma marcação moderada ao carboidrato metil- α -D-manósido.
- As lectinas *peanut agglutinin* (PNA) e *Ulex European agglutinin I* (UEA), apresentaram o padrão de marcação mais fraco, pela ligação a D-galactose e e L-fucose respectivamente.
- O biofilme é uma característica de alto valor de patogenicidade, que demonstra uma resistência elevada ao tratamento convencional com anfotericina B.

REFERÊNCIAS

- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology*. New York, John Wiley.
- Alvarez, M., Casadevall, A. 2006. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. *Curr Biol* 16: 2161-2165.
- Ambrosi, M., Cameron, N.R., Davis, B.G. 2005. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycocode. *Organic & Biomolecular Chemistry* 3: 593-1608.
- Barbosa, F.M., Fonseca, F.L., Figueiredo, R.T., Bozza, M.T., Casadevall, A., Nimrichter, L., Rodrigues, M.L. 2007. Binding of glucuronoxylomannan to the CD14 receptor in human A549 alveolar cells induces interleukin-8 production. *Clinical and Vaccine Immunology* 14: 94-98.
- Barbosa, F.M., Fonseca, F.L., Holandino, C., Alviano, C.S., Nimrichter, L., Rodrigues, M.L. 2006. Glucuronoxylomannan-mediated interaction of *Cryptococcus neoformans* with human alveolar cells results in fungal internalization and host cell damage. *Microbes and Infection* 8: 493-502.
- Baroni, F.A., Paula, C.R., Silva, E.G., Viani, F.C., Rivera, I.N., Oliveira, M.T. 2006. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro city, RJ, Brazil. Ver. *Inst. Med. Trop* 48: 71-75.
- Bialek, R., Weiss, M., Becure-Nemariam, K., Najvar, L.K., Alberdi, M.B., Graybill, J.R., Reischl, U. 2002. Detection of *Cryptococcus neoformans* DNA in Tissue Samples by Nested and Real-Time PCR Assays. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 461-469.
- Bicanic, T., Harrison, T.S. 2005. Cryptococcal meningitis. *Br Med Bull* 72: 99-118.
- Birchard, S.J., Sherding, R.G. 1998. Clinica de Pequenos Animais, Manual Saunders. Roca, PP 1406-08.
- Bovers, M., Diaz, M.R., Hagen, F., Spanjaard, L., Duim, B., Visser, C.E., Oogveld, H.L., Scharringa, J., Hoepelman, I.M., Fell, J.W., Boekhout, T. 2007. Identification of genotypically diverse *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates by Luminex xMAP technology. *Journal of Clinical Microbiology* 45: 1874-1883.
- Buschke, A. 1895. Über eine durch coccidien hervergerufene krankheit des menschen. *Deutsche medizinische Wochenschrift* 21: 14.
- Capoor, M.R., Nair, D., Deb, M., Gupta, B., Aggarwal, P. 2007. Clinical and mycological profile of cryptococcosis in a tertiary care hospital. *Indian Journal of medical Microbiology* 25: 401-404.
- Cardoso, B. C. Efeito de antifúngicos em suspensões e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*. 2004. 75f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Universidade do Minho.

- Carfarchia, C., Camarda, A., Romito, D., Campolo, M., Quaglia, N.C., Tullio, D., Otranto, D. 2006. Occurrence of yeast in cloacae of migratory birds. *Mycopathologia* 161: 229-34.
- Casadevall, A., Perfect, J.R. 1998. *Cryptococcus neoformans*. ASM Press, Washington, D.C.
- Casadevall, A., Steenbergen, J.N., Nosanchuk, J.D. 2003. 'Ready made' virulence and 'dual use' virulence factors in pathogenic environmental fungi - The *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Current Opinion in Microbiology* 6: 332-37.
- Casali, A.K., Goulart, L., Rosa e Silva, L.K., Ribeiro, A.M., Amaral, A.A., Alves, S.H., Schrank, A., Meyer, W., Vainstein, M.H. 2003. Molecular typing of clinical na environmental *Cryptococcus neoformans* in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *FEMS Yeast Res* 3: 406-415.
- Chandra, J. *et al.* 2001. Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. *Journal of Bacteriology* 183 (18): 5385-5394.
- Chang, Z.L., Netski, D., Thorkildson, P., Kozel, T.R. 2006. Binding and internalization of glucuronoxylomannan, the major capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans*, by murine peritoneal macrophages. *Infection and Immunity* 74: 144-151.
- Chayakulkeeree, M., Perfect, J.R. 2006. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am* 20: 507-544.
- Christensen, W.B. 1946. Urea decomposition as a means of differentiating Proteus and paracolon cultures from each other and from Salmonella and Shigella types. *Journal of Bacteriology* 52: 461-6.
- Chuang, Y.-M., Ku, S.C., Liaw, S.J., Wu, S.C., Ho, Y.C., Yu, C.J., Hsueh, P.R. 2010. Disseminated *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* infections in intensive care units. *Epidemiol. Infect.* 138: 1036-1043.
- Consenso em Criptococose. 2008. Relatório Técnico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41: 524-544.
- Cox, G.M., Mukherjee, J., Cole, G.T., Casadevall, A., Perfect, J.R. 2000. Urease as a Virulence Factor in Experimental Cryptococcosis. *Infect Immun* 68(2): 443-448.
- Datta, K., Bartlett, K.H., Marr, K.A. 2009. *Cryptococcus gattii* : Emergence in Western North America: Exploitation of a Novel Ecological Niche. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious diseases*.
- De Hoog, G.S., Guarro, J., Gené, J., Figueiras, M.J. 2000. Atlas of Clinical Fungi. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmislcultures. *Baarn* 2: 130-174.
- Del Poeta, M. 2004. Role of Phagocytosis in the Virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* 3: 1067-1075.
- Denning, D.W. 2003. Echinocandin antifungal drugs. *New Drug. Classes*. 362: 1142-1151.

- Di Bonaventura, G., Pompilio, A., Picciani, C., Iezzi, M., D'Antonio, D., Piccolomini, R. 2006. Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture, and antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 50(10): 3269-76.
- Dorlan, R.M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 881–890.
- Dorlan, R. M.; Costerton. J. W. 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, Atlanta, Geórgia 15(2): 167-193.
- Drouhet, E. 1997. Milestones in the history of *Cryptococcus* and cryptococcosis. *J. Mycol. Med.* 7: 10-27.
- Elgavish, S., Shannan, B. 1997. Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. *Trends Biochem. Sci.* 22: 462-467.
- Ellerbroek, P.M., Ulfman, L.H., Hoepelman, A.I., Coenjaerts, F.E. 2004. Cryptococcal glucuronoxylomannan interferes with neutrophil rolling on the endothelium. *Cellular and Microbiology* 6: 581-592.
- Faganello, J., Arruda, W., Schrank, A., Vainstein, M.H. 2006. An alternative method to prepare samples of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* for scanning electron microscopy analysis. *J Microbil Methods* 64 (3): 416-419.
- Feldmesser, M.Y., Novikoff, K.P., Casadevall, A. 2000. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infection and Immunity* 68: 4225-4237.
- Feldmesser, M., Tucker, S., Casadevall, A. 2001. Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. *Trends in Microbiology* 9: 273-278.
- Fell, J.W., Statzell-Tallman, A. 1998. *Cryptococcus Vuillemin*. In: Kurtzman, C. P. and Fell, J. W. (Eds.), *The yeasts: a taxonomic study*, Amsterdam, The Netherlands: Elsevier 742–767.
- Fisher, F., Cook, N.B. 2001. Micologia: fundamentos e diagnóstico. *Revinter* 337.
- Fisher, F., Cook, N.B. 2001. Leveduras e organismos leveduriformes. *Micol. Fund. Diagnós.*, Rio de Janeiro: *Revinter* 193-224.
- Fries, B.C., Goldman, D.L., Cherniak, R., Ju, R., Casadevall, A. 1999. Phenotypic Switching in *Cryptococcus neoformans* Results in Changes in Cellular Morphology and Glucuronoxylomannan Structure. *Infect Immun* 67 (11): 6076-6083.
- Fries, B.C., Taborda, C.P., Serfass, E., Casadevall, A. 2001. Phenotypic Switching in *Cryptococcus neoformans* occurs in vivo and influences the outcome of infection. *J Clin Invest* 108 (11): 1639-48.
- Fromtling, R.A., Shadomy, H.J., Jacobson, E.D. 1982. Decreased virulence in stable, acapsular mutants of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 79 (1): 23-9.
- Garcia-Hermoso, D., Janbon, G., Dromer, F. 1999. Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. *J. Clin. Microbiol.* 37 (10): 3204-3209.

- Gognies, S., Belarbi, A. 2010. Use of a new gelling agent (Eladium©) as an alternative to agar-agar and its adaptation to screen biofilm-forming yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* 88: 1095–1102.
- Goldman, D.L., Khine, H., Abadi, J., Lindenberg, D.J., Pirofski, L.A., Niang, R., Casadevall, A. 2001. Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood: *Pediatrics* 107 (5): E66.
- Graybill, J.R. 2000. The role of murine models in the development of antifungal therapy for systemic mycosis. *Drug. Resist. Updat.* 3: 364-383.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 95–108.
- Harrison, T.S. 2000. *Cryptococcus neoformans* and cryptococcosis. *J. infect.* 41:12-17.
- Huang, C., Nong, S.H., Mansour, M.K., Specht, C.A., Levitz, S.M. 2002. Purification and characterization of a second immunoreactive manoprotein from *Cryptococcus neoformans* that stimulates T-cell responses. *Infect Immun* 70 (10): 5485-93.
- Ikeda, R., Shinoda, T., Fukazawa, Y., Kaufman, L. 1982. Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 16: 22-29.
- Ikeda, R., Sugita, T., Jacobson, E.S., Shinoda, T. 2002. Laccase and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 1214-1218.
- Indurm, A., Bahn, Y.S., Nielsen, K., Lin, X., Fraser, J.A., Heitman, J. 2005. Deciphering the Model Pathogenic Fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nat Rev Microbiol* 3: 753-764.
- Janbon, G. 2004. *Cryptococcus neoformans* capsule biosynthesis and regulation. *FEMS Yeast Res* 4 (8): 765-771.
- Jarvis, J.N., Harrison T.S. 2007. HIV-associated cryptococcal meningitis. *AIDS* 21: 2119-2129.
- Jungerman, P.F., Schwartzman, R.M. 1972. Veterinary Medical Mycology. Philadelphia: Lea & Febiger 200.
- Khan, Z.U., Al-Anezi, A.A., Chandy, R., Xu, J. 2003. Disseminated cryptococcosis in an AIDS patient caused by a canavanine-resistant strain of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. *Journal of Medical Microbiology* 52: 271-275.
- Komath, S.S., Kavitha, M., Swamy, A.M. 2006. Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research. *Organic & Biomolecular Chemistry* 4: 973-988.
- Kwon-Chung, K.J., Bennett, J.E. 1992. Medical Mycology. Philadelphia: Lea e Figiber. 866.
- Kwon-Chung, K.J., Polacheck, I., Bennet, J.E. 1982. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *Journal of Clinical Microbiology* 115: 535-537.

- Kwon-Chung, K.J. 1975. A new species of *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycology* 67: 1197-1200.
- Kwon-Chung, K.J. 1998. Gene disruption to evaluate the role of fungal candidate virulence genes. *Current Opinion in Microbiology* 1: 381-389.
- Kwon-Chung, K.J., Boekhout, T., Fell, J. W.; Diaz, M. 2002. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon* 51: 804-806.
- Kwon-Chung, K.J., Bennett, J.E. 1992. Cryptococcosis. In: (Ed.). *Med. Mycol.* Philadelphia: *Lea & Febiger* 397- 446.
- La Tourette Prosser B., Taylor D., Dix, B.A. 2003. Cleeland R. Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (31) 1502-1506.
- Lacaz, C.S., Porto, E., Martins, J.E.C., Heins-Vaccari, E.M., Melo, N.T. 2002. Criptococose. *Trat. Micol. Méd.* Lacaz, São Paulo: *Sarvier* 9: 416- 440.
- Lazéra, M.S., Igreja, R.P., Wanke, B. Criptococose. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA M. F. G. 2004. *Micologia Médica: Á luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: *Editora Guanabara Koogan S.A.* 89-101.
- Lazéra, M.S., Salmito Cavalcanti, M.A., Londero, A.T., Trilles, L., Nishikawa, M.M., Wanke, B. 2000. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Medical Mycology* 38: 379-383.
- Leal, A.L., Faganello, J., Fuentesfria, A.M., Boldo, J.T., Bassanessi, M.C., Vainstein, M.H. 2008. Epidemiological of cryptococcal meningitis pacientes in Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia* 166 (2): 71-75.
- Lemke, A., Kiderlen, A.F. et al. 2005. Amphotericin B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68 (2): 151-62.
- Lengeler, K.B., Cox, G.M., Heitman, J. 2001. Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating-type locus. *Infection and Immunity* 69: 115-122.
- Lima-Neto, R.G., Beltrão, E.I., Oliveira, P.C., Neves, R.P. 2011. Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. *Mycoses* 54: 23-9.
- Lin, X., Heitman, J. 2006. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annual Review of Microbiology* 8: 69-105.
- Lindsay, D., Holy, V.A. 2008. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J Hosp Infect* 64: 313-325.
- Lis, H., Sharon, N. 1998. Lectins: carbohydrate specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews* 98: 637-674.

- Liu, T.B., Perlin, D., Xue, C. 2012. Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. *Virulence* 3: 173-181.
- Loftus, B.J., Fung, E., Roncaglia, P., Rowley, D., Amedeo, P., Bruno, D.V.V., Fu, J., Fukushima, M., Haas, B.J., Huang, J.C., Janbon, G., Jones, S.J., Koo, H.L., Krzywinski, M.I., Kwon-Chung, J.K., Lengeler, K.B., Maiti, R., Marra, M.A., Marra, R.E., Mathewson, C.A., Mitchell, T.G., Perte, M., Schein, J.E., Shvartsbeyn, A., Shin, H., Shumway, M., Specht, C.A., Suh, B.B., Tenney, A., Utterback, T.R., Wickes, B.L., Wortman, J.R., Wye, N.H., Ronstad, J.W., Lodge, J.K., Heitman, J., Davis, R.W., Fraser, C.M., Hyman, R.W. 2005. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science* 25 (5713): 1321-1324.
- Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J., Wyns, L. 1998. Legume lectin structure. *Biochem. Biophys. Acta*. 1383: 9-36.
- Ma, H., Croudace, J.E., Lamm, D.A., May, R.C. 2006. Expulsion of Live Pathogenic Yeast by Macrophages. *Current Biology* 16: 2156-2160.
- Ma, H., May, R.C. 2009. Virulence in *Cryptococcus* species. *Advances in Applied Microbiology* 67: 131-90.
- Mah, T.F., O'Toole, G.A. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 9(1):34-9.
- Marra, R.E., Huang, J.C., Fung, E., Nielsen, K., Heitman, J., Vilgalys, R., Mitchell, T.G. 2004. A genetic linkage map of *Cryptococcus neoformans* variety *neoformans* serotype D (*Filobasidiella neoformans*). *Genetics* 167: 619-631.
- Martinez, L.R., Casadevall, A. 2005. Specific antibody can prevent fungal biofilm formation and this effect correlates with protective efficacy. *Infect Immun* 73: 6350-62.
- Martinez, L.R., Casadevall, A. 2006. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 1021-33.
- Martinez, L.R., Casadevall, A. 2006. *Cryptococcus neoformans* Cells in Biofilms Are Less Susceptible than Planktonic Cells to Antimicrobial Molecules Produced by the Innate Immune System. *Infection and Immunity* 74: 6118-6123.
- Martinez, L.R., Casadevall, A. 2007. *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV light. *Appl Environ Microbiol* 73(14): 4592-601.
- Martinez, L.R., Casadevall, A., Fries, B.C. 2008. Characterization of Phenotypic Switching in *Cryptococcus neoformans* Biofilms. *Mycopathologia* 166:175-180.
- Martinez, L.R., Ibom, D.C., Casadevall, A., Fries, B.C. 2008. Characterization of Phenotypic Switching in *Cryptococcus neoformans* Biofilms. *Mycopathologia* 166: 175-180.
- Martinez, L.R., Mihi, M.R., Han, G., Frases, S., Cordero, R.J.B., Casadevall, A., Friedman, A.J., Friedman, J.M., Nosanchuk, J.D. 2010. The use of chitosan to damage *Cryptococcus neoformans* biofilms. *Biomaterials* 31: 669-679.

- Matsui, T., Hamako, J., Ozeki, Y., Titani, K. 2001. Comparative study of blood group-recognizing lectins toward ABO blood group antigens on neoglycoproteins, glycoproteins and complex-type oligosaccharides. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects* 1525: 50-57.
- Mcclelland, E.E., Bernhardt, P., Casadevall, A. 2006. Estimating the relative contributions of virulence factors for pathogenic microbes. *Infect. Immun.* 74 (3): 1500-1504.
- Mcfadden, D.C., Casadevall, A. 2001. Capsule and melanin synthesis in *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol* 39: 19-30.
- Menezes, E.A., Monteiro, M.N.R., Angelo, M.R.F., Santos, C.D., Freirie, C.C.F., Cunha, F.A. 2002. *Cryptococcus neoformans* causing meningitis in AIDS patients. *Rev Soc Bras Med Trop* 35 (5): 537-539.
- Ministério da Saúde do Brasil. 2012. Vigilância e Epidemiológica da Criptococose.
- Mitchell, T.G., Perfect, J.R. 1995. Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Microb. Reviews, Durham* 8 (4): 515-548.
- Monari, C., Bistoni, F., Casadevall, A., Pericolini, E., Pietrella, D., Kozel, T.R.; Vecchiarelli, A. 2005a. Glucuronoxylomannan, a microbial compound, regulates expression of costimulatory molecules and production of cytokines in macrophages. *The Journal of Infectious Diseases* 191: 127-137.
- Monari, C., Bistoni, F., Vecchiarelli, A. 2006. Glucuroxylomannan exhibits potent immunosuppressive properties. *FEMS Yeast Res* 6 (4): 537-42.
- Monari, C., Pericolini, E., Bistoni, G., Casadevall, A., Kozel, T.R.; Vecchiarelli, A. 2005b. *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan induces expression of fas ligand in macrophages. *The Journal of Immunology* 174: 3461-3468.
- Moreira, T.A., Ferreira, M.M.S., Ribas, R.M., Borges, A.S. 2006. Criptococose: estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39: 255-258.
- Moyrand, F., Klaproth, B., Himmelreich, U., Dromer, F., Janbon, G. 2002. Isolation and characterization of capsule structure mutant strains of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology* 45: 837-849.
- Mukherjee, P.K., Sheehan, D.J., Hithcock, C.A., Ghannoum, M.A. 2005. Combination treatment of invasive fungal infections. *Clin. Microbiol. Ver.* 18: 163-194.
- Nakamura, Y., Kano, R., Sato, H., Watanabe, S., Takahashi, H., Hasegawa, A. 1998. Isolates of *Cryptococcus neoformans* serotype A and D developed on canavanine-glycine-bromthymol blue medium. *Mycoses* 41: 35-40.
- Namiq, A.L., Tollefson, T., Fan, F. 2005. Cryptococcal parotitis presenting as a cystic parotid mass: Report of a case diagnosed by fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol* 33 (1): 36-38.

- Nardelli, V., Celina, P., Mata-Essayag, S., Colella, M.T., Roselló, A., Hartung De Capriles, C., Landaeta, M.E., Olaizola, C.M.S. 2005. Identification of *Cryptococcus neoformans* isolates using Staib agar without creatinine. *Kasmera* 33: 102-108.
- Oliveira, D.L., Nimrichter, L., Miranda, K., Frases, S., Faull, K.F., Casadevall, A., Rodrigues, M.L. 2009. *Cryptococcus neoformans* cryoultramicrotomy and vesicle fractionation reveals an intimate association between membrane lipids and glucuronoxylomannan. *Fungal Genet Biol* 46: 956-963.
- Osuna, P., Carragoso, A., Lemos, A., Mocho, M.L., Gaspar, O. 2008. Criptococose. *Acta Medica Portuguesa* 21: 307-313.
- Ozer, E. 2000. Effects of prenatal exposure on neuronal migration, neurogenesis and brain myelinization in the mice brain. *Clin. Neuropathol.* 19: 21-5.
- Paschoal, R.C., Hirata, M.H., Hirata, R.C., Melhem, M.S.C., Dias, A.L.T., Paula, C.R. 2004. Neurocryptococcosis: diagnosis by PCR method. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 46: 203-207.
- Patil, R.T., Sangwan, J., Juya, D., Lathwa, S. 2013. Meningitis due to *Cryptococcus gattii* in an immunocompetent patient. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 7: 2274-2275.
- Pauw, B.E. 2000. New antifungal agents and preparations. *International Journal of Antimicrobial Agents* 16: 147-150.
- Pedroso, R.S., Candido, R.C. 2006. Diagnóstico laboratorial da criptococose. *NewsLab* 77: 94-102.
- Pedroso, R.S., Ferreira, J.C., Candido, R.C. 2009. The isolation and characterization of virulence factors of *Cryptococcus* spp. from saprophytic sources in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Microbiol Reserch* 164: 221-227.
- Pessoa, C.C.B., Silva, S.H.M., Gomes, F.S. 2012. Produção de fatores de virulência in vitro por isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. *Rev Pan-Amaz Saude* 3(2):59-65.
- Perfect, J.R., Casadevall, A. 2002. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am* 16 (4): 837-874.
- Pfaller, M.A., Messer, S.A., Hollis, R.J. 1995. Variation in DNA subtype, antifungal susceptibility, and slime production among clinical isolates of *Candida parapsilosis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 21: 9-14.
- Pinto Junior, V.L., Galhardo, M.C.G., Lazéra, M., Wanke, B., Reis, R.S., Perez, M. 2006. Criptococose associada à AIDS. A importância do cultivo da urina no seu diagnóstico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39: 230-232.
- Pitzurra, L., Vechiarelli, A., Peducci, R., Cardinali, A., Bistoni, F. 1997. Identification of a 105 kilodalton *Cryptococcus neoformans* mannprotein involved in human cell mediated immune response. *J. Med. Vet. Mycol.* 35 (4): 299-303.
- Polacheck, I., Hearing, V.J., Kwon-Chung, K.J. 1982. Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. *J. Bacteriol.* 150 (3): 1212-1220.

- Potts, S.J., Thompson, J.F., Slaughter, D.C. 2001. The effect of fungal species on the fluorescent lectin test. *Journal of Microbiological Methods* 46: 187-191.
- Ramage, G. *et al.* 2005. *Candida* Biofilms: an Update. *American Society for Microbiology* 4(4): 633-638.
- Ramage, G., Coco, B., Sherry, L., Bagg, Jeremy, Lappin, D.F. 2012. *In vitro Candida albicans* biofilm induced proteinase activity and SAP8 expression correlates with *in vivo* denture stomatitis severity. *Mycopathologia* 174: 11-19.
- Rappelli, P., Are, R., Casu, G., Fiori, P.L., Cappuccinelli, P., Aceti, A. 1998. Developmente os a Nested PCR for Detection of *Cryptococcus neoformans* in Cerebrospinal Fluid. *J. Clin. Microbiol.* 36: 3438-3440.
- Ravi, S., Pierce, C., Witt, C., Wormley Jr, F.L. 2009. Biofilm formation by *Cryptococcus neoformans* under distinct environmental conditions. *Mycopathologia* 167(6): 307-14.
- Reolon, A., Perez, L.R.R., Mezzari, A. 2004. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 40: 293-298.
- Rodrigues, M.L., Alvarez, M., Fonseca, F.L., Casadevall, A. 2008. Binding of the Wheat Germ Lectin to *Cryptococcus neoformans* Suggests an Association of Chitinlike Structures with Yeast Budding and Capsular Glucuronoxylomannan. *Eukaryotic Cell* 7: 602-609.
- Rodrigues, M.L., Fonseca, F.L. 2009. The still obscure attributes of cryptococcal glucuronoxylomannan. *Med Mycol* 1-7.
- Rodrigues, M.L., Nimrichter, L., Oliveira, D.L., Frases, S., Miranda, K., Zaragoza, O., Alvarez, M., Nakouzi, A., Feldmesser, M., Casadevall, A. 2007. Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryotic Cell* 6: 48-59.
- Rodríguez-Cerdeira, C., Arenas, R., Moreno-Coutiño, G., Vázquez, E., Fernández, R., Chang, P. 2014. Micosis sistémicas en pacientes con virus de la inmunodeficiencia humana/SIDA. *Actas Dermosifiliogr.* 105: 5-17.
- Rosario I., Acosta, B., Colom, F. 2008. La paloma y otras aves como reservorio de *Cryptococcus* spp: pigeons and other birds as a reservoir for *Cryptococcus* spp. *Revista Iberoamericana de Micología* 25: 13-18.
- Sanfelice, F. 1894. Contributo alla morfologia e biologia dei blastomiceti Che si sviluppano nei succhi di alcuni frutti. *Ann. Igien.* 4: 463-495.
- Sanfelice, F. 1895. Sull'azione patogena dei blatomiceti. *Ann. Inst. Ingien. Univ. Roma.* 5: 239-262.
- Santi, L., Beys-da-Silva, W.O., Berger, M., Calzolari, D., Guimarães, J.A., Moresco, J.J., Yates, J.R. 2014. Proteomic Profile of *Cryptococcus neoformans* Biofilm Reveals Changes in Metabolic Processes. *Journal of Proteome Research* dx.doi.org/10.1021/pr401075f.

- Santos, A.C.O. 2001. Feijão camaratu, *Cratylia mollis*: Aspectos estruturais e ultraestruturais, purificação, caracterização e imunolocalização de isolectinas (Tese de Doutorado) CCB-UFPE Brasil 126.
- Shields, A., Ajello, L. 1966. Medium for selective isolation of *Cryptococcus neoformans*. *Science* 151: 208-9.
- Silva, A.C.G., Marchiori, E., Souza Jr., A.S.S., Irion, K.L. 2003. Criptococose pulmonar: aspectos na tomografia computadorizada. *Radiol. Bras. Niterói* 36 (5): 277-282.
- Sorrell, T.C., Ellis, D.H. 1997. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Rev Iberoam Micol* 14: 42-43.
- Staib, F. 1962. *Cryptococcus neoformans* in canaries. *Archiv fur Hygiene Bakteriologie* 185: 129-34.
- Steenbergen, J.N., Casadevall, A. 2003. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes and Infection* 5: 667-675.
- Steenbergen, J.N., Shuman, H.A., Casadevall, A. 2001. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 98: 15245-15250.
- Št'ovic'ek, V., Vachova, L., Kuthan, M., Palkova, Z. 2010. General factors important for the formation of structured biofilm-like yeast colonies. *Fungal Genetics and Biology* 47: 1012-1022.
- Suzuki, L. C. 2009. Desenvolvimento de biofilme formado por *Candida albicans* in vitro para estudo da terapia fotodinâmica. 48f. Tese (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear - Materias)- Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Teixeira, E.H., Napimoga, M.H, Carneiro, V.A., De Oliveira, T.M., Nascimento, K.S., Nagano C.S., Souza, J.B., Havt, A., Pinto, V.P.T., Gonçalves, R.B., Farias, W.R.L., Saker-Sampaio, S., Sampaio, A.H., Cavada, B.S. 2007. *In vitro* inhibition of oral streptococci binding to the acquired pellicle by algal lectins. *Journal of Applied Microbiology* 103: 1001-1006.
- Trilles, L., Lazéra, M., Wanke, B., Theelen, B., Boekhout, T. 2003. Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. *Medical Mycology* 41: 383-390.
- Vartivarian, S.E., Reyes, G.H., Jacobson, E.S., James, P.G., Cherniak, R., Mumaw, V.R., Tingler, M.J. 1989. Localization of mannoprotein in *Cryptococcus neoformans*. *J. Bacteriol.* 171 (12): 6850-6852.
- Vecchiarelli A. 2000. Immunoregulation by capsular components of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol* 38 (6): 407-17.
- Villena, S.N., Pinheiro, R.O., Pinheiro, C.S., Nunes, M.P., Takiya, C.M., Dosreis, G.A., Previato, J.O., Mendonça-Previato, L., Freire-De-Lima, C.G. 2008. Capsular polysaccharides

galactoxylomannan and glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* induce macrophage apoptosis mediated by Fas ligand. *Cell Microbiol* 10: 1274-1285.

Walenkamp, A.M., Chaka, W.S., Verheul, A.F., Vaishnav, V.V., Cherniak, R., Coenjaerts, F.E., Hoepelman, I.M. 1999. *Cryptococcus neoformans* and its cell wall components induce similar cytokine profiles in human peripheral blood mononuclear cells despite differences in structure. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 26 (34): 309-318.

Winn, W.C., Koneman, E.W. 2008. Koneman: Diagnóstico Microbiológico texto e atlas colorido. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 1535 (6): 30.

Yoneda, A., Doering, T.L. 2006. A eukaryotic capsular polysaccharide is synthesized intracellularly and secreted via exocytosis. *Molecular Biology of the Cell* 17: 5131-5140.

Zaragoza, O., Fries, B.C., Casadevall, A. 2003. Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO₂. *Infect immun* 71 (11): 6155-6164.