

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

**ORIONALDA DE FÁTIMA LISBOA FERNANDES**

**FATORES DE VIRULÊNCIA EM *Cryptococcus neoformans*.  
SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* E ALTERAÇÕES MORFOLOGICAS EM  
CÉLULAS MELANIZADAS E NÃO MELANIZADAS NA PRESENÇA  
DE VORICONAZOL, ANFOTERICINA B E EXTRATO BRUTO DA  
FOLHA DE *P. pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria do Rosário Rodrigues Silva  
Co-orientador: Prof<sup>º</sup>. Dr. Ruy de Souza Lino Junior**

**Goiânia – 2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E  
SAÚDE PÚBLICA**

**ORIONALDA DE FÁTIMA LISBOA FERNANDES**

**FATORES DE VIRULÊNCIA EM *Cryptococcus neoformans*.  
SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* E ALTERAÇÕES MORFOLOGICAS EM  
CÉLULAS MELANIZADAS E NÃO MELANIZADAS NA PRESENÇA  
DE VORICONAZOL, ANFOTERICINA B E EXTRATO BRUTO DA  
FOLHA DE *P. pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria do Rosário Rodrigues Silva

Co-orientador: Prof<sup>º</sup>. Dr. Ruy de Souza Lino Junior

**Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de  
Goiás como requisito para obtenção do Grau de Doutor em  
Medicina Tropical, na área de concentração de Microbiologia.**

**Goiânia, 2010**

*"Há pessoas que transformam o sol numa mancha amarela, mas há aquelas que fazem de uma simples mancha amarela o próprio sol"*

*Picasso*

*Junto com o meu obrigado pelo carinho, confiança e amizade que me dedicam, e, por me fazerem ver o quanto a vida me é generosa, ofereço este momento ao Wilton e Pilar, agora mais do que nunca eternizados em meu coração.*

## Agradecimentos

Meu Deus querido Te agradeço, por me proporcionar a saúde, a fé, a esperança e a força, permitindo assim que eu aqui chegasse.

À minha amiga e orientadora, Profa Dra Maria do Rosário Rodrigues Silva pelo carinho, conselhos, por me incentivar a não perder a esperança nunca. Pelos ensinamentos e, principalmente, por tudo o que faz, com tanta bondade, compreensão, competência e paciência, que me enchem de gratidão por ter a sua amizade. Agradeço a nossa amizade.

Amiga Profa Dra Lúcia Kíoko Hasimoto e Souza, os únicos bens duráveis, imutáveis e sem preço, são o afeto e a solidariedade que sentimos pelas pessoas queridas. Obrigada pela nossa amizade.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior, não somente por toda sua contribuição para a realização deste trabalho, mas também pela sua paciência, boa vontade, pelos ensinamentos e amizade. *“Julga-se o homem capaz de grandes coisas pela atenção que presta as pequenas”*. Obrigada Ruy.

Prof. Dr. Alverne Passos Barbosa, *nada é maior do que a solidariedade e por ela a gente não agradece, se alegra*. Mesmo assim não posso deixar de agradecer por sua paciência, atenção, amizade, e incentivos constantes, além da prestativa e valiosa colaboração, cedendo-me seu aparelho fotomicroscópio o qual me foi extremamente útil.

Aos meus nobres mestres, meus colegas de trabalho, que se desempenharam como sempre, solidários e corretos, durante minha jornada de pós-graduanda. *Todos nós temos momentos brilhantes, e a maioria deles são graças ao estímulo e colaboração de outras pessoas. Essa conquista também é de vocês!*

Amigos doutorandos, mestrandos, monitores bolsistas e funcionários do Laboratório de Micologia nas pessoas de Hildene, Fábio, Carolina, Flavio, Genebaldo, Mayara, Maysa, Gustavo, Núbia, Milton, Murilo, Cícero Junior e Percília: *A essência da vida é a emoção que existe dentro de cada um de nós, é a nossa atitude para com os outros. Obrigada pelo carinho.*

Aos colegas do Curso de Doutorado, pela amizade, respeito, atenção e pelos conhecimentos trocados.

Professores (as), funcionários e alunos de pós-graduação dos laboratórios de Bacteriologia e Virologia: Serei eternamente grata a vocês ao cederem seus préstimos todas as vezes que solicitados. Sempre dispostos e gentis.

Funcionários técnico-administrativos da secretaria do IPTSP/UFG e do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da UFG, pela atenção, carinho e incentivo nos momentos especiais, minha gratidão.

Professor Dr. José Realino de Paula, da Faculdade de Farmácia: Universidade Federal de Goiás, UFG, e à Profa. M. Sc. Joelma Abadia Marciano de Paula da Universidade Estadual de Goiás, por me cederem gentilmente o extrato da planta *P. pseudocaryophyllus*, o que muito contribuiu para o desenvolvimento desta pesquisa.

Faço um **especial agradecimento** aos componentes da banca examinadora Profs. Dra. Maria do Rosário Rodrigues Silva, Marcia de Souza Carvalho Melhen, Rosália Santos Amorim Jesuino, José Realino de Paula e Lúcia Kioko Hasimoto e Souza pelas suas importantes sugestões em contribuição para o encaminhamento final do trabalho aqui proposto.

Finalmente quero dizer que a conclusão deste trabalho foi possível graças ao incentivo, colaboração e o carinho de muitas pessoas, a quem hoje eu devo dizer mais uma vez: Muito obrigada.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da célula de <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	4
Figura 2. Características do complexo <i>Cryptococcus neoformans</i> . Adaptação: Lin & Heitman 2006; Nishikawa et al. 2003; Franzot et al. 1999; Kwon-Chung & Bennett, 1992 .....	7
Figura 3. Alguns fatores de virulência de <i>C. neoformans</i> e sua relação com o.....	9
Figura 4. Unidades de Glucuroxilomanana de <i>C. neoformans</i> caracterizando os diferentes sorotipos. (1) sorotipo D; (2) sorotipo A; (3) sorotipo B; (4) sorotipo C.....	11
Figura 5. Localização dos diferentes componentes estruturais da Galactoxilomanana de <i>C. neoformans</i> .....	12
Figura 6. Vesículas contendo GXM formadas no citoplasma atravessando a parede .....	13
Figura 7. Síntese de melanina utilizando L-3,4-dihidroxifenilalanina como substrato...15	
Figura 8. Sítio de ação de diferentes antifúngicos sobre a célula fúngica. ....	19
Figura 9. Distribuição do bioma brasileiro. ....	22
Figura 10. Aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos de <i>C. neoformans</i> . ....	27
Figura 11. Obtenção de células de <i>C. neoformans</i> melanizadas e não melanizadas segundo van-Duin et al.( 2004). ....	28
Figura 12. Procedimento para a produção de cápsula de <i>C. neoformans</i> (Zaragoza & Casadevall 2004) submetidos ou não á melanização e medida da espessura da cápsula e parede celular através de morfometria usando o programa <i>image J</i> NIH. ....	29
Figura 13. Esquema da avaliação da produção de fosfolipase segundo Price et al. (1982). ....	30
Figura 14. Placa de microtitulação esquematizando o teste de suscetibilidade <i>in vitro</i> pelo método de microdiluição em caldo. ....	31
Figura 15. Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) de voriconazol em meio de ágar Sabouraud dextrose. (A)-CIM, (B)-2X CIM, (C)-4X CIM. ....	32
Figura 16. Etapas experimentais para a medida da cápsula e da parede de <i>C. neoformans</i> sob a ação de voriconazol (Vcz), anfotericina B (Amb) e extrato de <i>P. pseudocaryophyllus</i> (Pp) em meio de caldo Sabouraud dextrose (CSD) adicionado de ácido morfolino-propanossulfônico (MOPS). ....	34

Figura 17. Celulas de <i>C. neoformans</i> com cinco dias de crescimento. (A) Meio indutor de melanina: meio mínimo com L-DOPA. (B) Meio não indutor: meio mínimo sem L-DOPA.....	35
Figura 18. Fotomicrografia da cápsula e da parede celular de <i>C. neoformans</i> melanizados e não melanizados utilizando tinta da China. (Escala= 3µm).....	36
Figura 19. Mediana da espessura da cápsula e da parede de isolados de <i>C. neoformans</i> melanizados e não melanizados (n=1020).....	36
Figura 20. Atividade enzimática dos isolados (%) de <i>C. neoformans</i> melanizados e não melanizados. Atividade fortemente positiva = $Pz < 0,64$ positiva e atividade positiva = $Pz > 0,64$ .....	37
Figura 21. Mediana da espessura da cápsula de isolados de <i>C. neoformans</i> melanizados e não melanizados na presença de voriconazol (n=180).....	39
Figura 22. Mediana da espessura da parede de isolados de <i>C. neoformans</i> melanizados e não melanizados na presença de voriconazol (n=180). .....	39
Figura 23. Espessura da cápsula e parede de <i>C. neoformans</i> melanizados e não melanizados sob a ação de voriconazol. ....	40
Figura 24. Mediana da espessura da cápsula de <i>C. neoformans</i> na presença de anfotericina B (n=180).....	41
Figura 25. Mediana da espessura da parede de isolados de <i>C. neoformans</i> melanizados e não melanizados na presença de anfotericina B (n=180).....	41
Figura 26. Espessura da cápsula e parede de <i>C. neoformans</i> melanizados e não melanizados sob a ação de anfotericina B.....	42
Figura 27. Mediana da espessura da cápsula de isolados de <i>C. neoformans</i> melanizados e não melanizados na presença de <i>P. pseudocaryophyllus</i> (n=180).....	43
Figura 28. Mediana da espessura da parede de isolados de <i>C. neoformans</i> melanizados e não melanizados na presença de <i>P. pseudocaryophyllus</i> (n=180). .....	43
Figura 29. Espessura da cápsula e parede de <i>C. neoformans</i> melanizados e não melanizados sob a ação de extrato da folha de <i>P. pseudocaryophyllus</i> . .....	44
Figura 30. Fotomicroscopia da espessura da cápsula e da parede de isolados de <i>C. neoformans</i> melanizados e não melanizados. Controle (sem fármaco e extrato da planta), e sob a ação dos antifungicos voriconazol; anfotericina B e extrato bruto da folha de <i>P. pseudocaryophyllus</i> . Visualização com tinta da China. (Escala 4µm). .....	44

**LISTA DE TABELA**

Tabela 1. Concentração inibitória mínima e fungicida ( $\mu\text{g/mL}$ ) de voriconazol, anfotericina B e extrato bruto da folha de *P. pseudocaryophyllus* para *C. neoformans* melanizados e não melanizados.

38

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AIDS/SIDA	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome/Síndrome da Imunodeficiência Adquirida</i>
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
ASD	Ágar sabouraud dextrose
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CFM	Concentração fungicida mínima
CGB	Canavanina glicina azul de bromotimol
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
GXM	Glucuroxilomanana
GalXM	Galactoxilomanana
HDT	Hospital de Doenças Tropicais
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
IDSA	<i>Infectious Diseases Society of America</i>
IL-	Interleucina
L-DOPA	L-dihidroxifenilalanina
LPB	Fosfolipase B
LPL	Lisofosfolipase
LPTA	Lisofosfolipase-transacilase
MOPS	Ácido morfolino propanossulfônico
MAT $\alpha$	<i>Mating type <math>\alpha</math></i>
MATa	<i>Mating type a</i>
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
Pz	Atividade enzimática
RAPD	<i>Random amplification of polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RPMI	<i>Meio Roswell Park Memorial Institute</i>
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
5-FU	5-fluorouracil

## RESUMO

Diferentes características fenotípicas como formação de cápsula polissacarídica, a expressão de lacase determinando a melanização em substratos fenólicos e produção de enzimas é prováveis fatores de virulência presentes nas espécies do complexo *Cryptococcus neoformans*. Neste trabalho foi avaliada a espessura da cápsula e da parede celular de isolados de *C. neoformans*. A atividade da fosfolipase e a suscetibilidade *in vitro* de *C. neoformans* à anfotericina B, voriconazol e ao extrato bruto da planta *Pimenta pseudocaryophyllus* foram também realizados para estes isolados. Os constituintes da célula como cápsula e parede celular foram ainda analisados quando sob a ação dos antifúngicos do extrato bruto da planta. A melanização das células foi obtida usando-se o meio mínimo adicionado de L-DOPA, a produção de fosfolipase foi feita em meio contendo gema de ovo, enquanto a suscetibilidade *in vitro* do microrganismo foi realizada pelo método de microdiluição em caldo seguindo o protocolo do CLSI. As células extraídas de um meio indutor de cápsula foram submetidas a uma concentração correspondente a 0,5 vezes da CIM obtida no teste de suscetibilidade *in vitro*, sendo medido o tamanho da cápsula e parede de 30 células de cada isolado e a média destes valores foi calculada. Os valores da espessura da cápsula de isolados de *C. neoformans* melanizados variaram de 1,20 a 1,90  $\mu\text{m}$  e de 2,63 a 5,12  $\mu\text{m}$  em não melanizados, quando submetidos ao meio de indução de cápsula. Com relação à parede, a variação foi de 0,80 a 1,09  $\mu\text{m}$  em células melanizadas e de 0,40 a 0,49  $\mu\text{m}$  em não melanizadas. A diferença para as medidas de cápsula, como de parede mostrou-se com valores estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ). Todos os isolados de *C. neoformans* foram capazes de produzir fosfolipase, sendo que os isolados melanizados apresentaram atividade desta enzima em 85,3%, enquanto nos não melanizados o percentual foi de 79,5%. A suscetibilidade do microrganismo melanizado ou não aos antifúngicos e ao extrato da planta mostrou-se equivalente, com a variação de CIM para voriconazol de 0,062-0,125  $\mu\text{g/mL}$ , 0,125-0,5  $\mu\text{g/mL}$  para anfotericina B e de 64 a 128  $\mu\text{g/mL}$  para o extrato bruto de *P. pseudocaryophyllus*. Os antifúngicos voriconazol e anfotericina B e extrato bruto de *P. pseudocaryophyllus*, induziram redução de espessura da cápsula e parede celular de *C. neoformans*, quando comparados com o controle (ausência do fármaco ou da extrato de planta) independente da presença ou não da melanina. As alterações verificadas na cápsula e parede celular de *C. neoformans* neste estudo poderão servir de guias para outras pesquisas direcionadas aos efeitos de antifúngicos na patogenia de criptococose.

## ABSTRACT

Different phenotypic characteristics such as polysaccharide capsule formation, the expression of laccase in phenolic substrates responsible by melanization and production of enzyme are factors of virulence which are present in the *C. neoformans* species complex. In this work, it was evaluated the thickness from capsule and cell wall in melanized and non-melanized *C. neoformans* isolates. Besides, it was verified the activity of phospholipase, and the *in vitro* susceptibility of these *C. neoformans* isolates. The cell components such capsule and cell wall were also analyzed in the presence of amphotericin B, voriconazole and crude extract of the plant, *P. pseudocaryophyllus*., Melanization was induced by growing cells on defined minimal medium broth with the addition L-DOPA, the phospholipase was performed by growth in medium containing egg yolk and the test *in vitro* susceptibility by broth microdilution method. Antifungal susceptibility tests were performed using the broth microdilution method. The yeast cells suspension extracted from capsule induction media was inoculated in SAB with voriconazole or amphotericin B and or crude extracts of *P. pseudocaryophyllus* at concentration corresponding to MIC 0.5 times. Both capsule and cell wall sizes of 30 cells were measured and the mean was calculated. The values of the thickness of the capsule ranged from 1.20 to 1.90  $\mu\text{m}$  and from 2.63 to 5.12  $\mu\text{m}$  in melanized and non-melanized *C. neoformans*, respectively. In relation to cell wall, the variation was from 0.80 to 1.09  $\mu\text{m}$  and from 0.40 to 0.49  $\mu\text{m}$  in melanized and non-melanized *C. neoformans*, respectively. The difference of capsule and wall cell thickness were statistically significant ( $p < 0.05$ ). All isolates of *C. neoformans* were able to produce phospholipase. Melanized isolates showed activity of this enzyme in 85.3%, while in non-melanized the percentage was 79.5%. The susceptibility to antifungal agents and the crude plant extract, of the two groups was similar. The MICs for drugs and plant extract were identical to non-melanized and melanized *C. neoformans* isolates. The MICs found for amphotericin B ranged from 0.125 to 0.5 mg/L, for voriconazole, from 0.062 to 0.125 mg/L and for *P. pseudocaryophyllus* from 64 to 128 mg/L. The capsule and cell wall thickness measurement of six isolates were smaller in the presence of drugs and crude extract of *P. pseudocaryophyllus* than in the yeast cells grown without drugs, regardless melanization. The findings regarding capsule and cell wall alterations of *C. neoformans* verified in this study provide fertile ways for future research into the effects of antifungal agents on the pathogenesis of cryptococcosis.

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.2 CRIPTOCOSE .....	1
1.3 COMPLEXO CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS.....	3
1.4 FATORES DE VIRULÊNCIA .....	8
1.4.1 Crescimento a 37°C.....	9
1.4.2 Cápsula.....	10
1.4.3 Melanina.....	14
1.4.4 Mating types.....	17
1.4.5 Produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase .....	17
1.5 TRATAMENTO DA CRIPTOCOSE .....	18
1.5.1 Antifúngicos.....	18
1.5.2 Mecanismos de Resistência .....	20
1.5.3 Plantas Medicinais e seus Produtos Naturais .....	21
1.5.4 Plantas Medicinais do Cerrado.....	22
1.6 TESTES DE SUSCETIBILIDADE.....	25
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
3.1 MICRORGANISMOS .....	27
3.2 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MELANIZADAS E NÃO MELANIZADAS DE <i>C. NEOFORMANS</i> .....	28
3.3 PRODUÇÃO DE CÁPSULA.....	28
3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE FOSFOLIPASE .....	29
3.5 TESTE DE SUSCETIBILIDADE IN VITRO .....	30
3.5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	30
3.5.2 Preparação do inóculo.....	31
3.5.3 Procedimento do teste .....	31
3.5.4 Incubação e leitura.....	32
3.5.5 Controle de qualidade .....	32
3.5.6 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM).....	32
3.5.7 Ação de voriconazol, anfotericina B e do extrato de <i>P. pseudocaryophyllus</i> sobre a cápsula e parede celular de <i>C. neoformans</i> melanizados e não melanizados.....	32
3.5.7.1 Inóculo.....	33
3.5.7.2 Preparo dos antifúngicos e do extrato da planta .....	33
3.5.7.3 Procedimento do teste.....	33
3.5.7.4 Controle.....	33
3.5.7.5 Análise do tamanho da cápsula e da parede.....	33
3.5.7.6 Análise estatística.....	34
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
4.1 MELANIZAÇÃO.....	35
4.2 ESPESSURA DA CÁPSULA E PAREDE .....	35
4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE FOSFOLIPASE .....	37
4.4 TESTE DE SUSCETIBILIDADE IN VITRO .....	37
4.5 AÇÃO DE VORICONAZOL, ANFOTERICINA B E EXTRATO BRUTO DA FOLHA DE <i>P. PSEUDICARYOPHYLLUS</i> NA ESPESSURA DA CÁPSULA E PAREDE CELULAR DE <i>C. NEOFORMANS</i> MELANIZADOS E NÃO MELANIZADOS. ....	38
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>50</b>

**7 REFERÊNCIAS .....52****ANEXOS: 72**

<i>Manuscrito enviado para publicação na revista Journal of Antimicrobial Chemotherapy</i> .....	72
<i>Artigo: Effects of Voriconazole, Amphotericin B and Pimenta pseudocaryophyllus (Gomes) L. R. Landrum on the capsule and cell wall of Cryptococcus neoformans.</i> .....	72
<i>Normas para publicação na revista Journal of Antimicrobial Chemotherapy</i> .....	72
<i>Protocolo da Comissão de Ética e Pesquisa</i> .....	72

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações gerais

Os fungos, largamente difundidos no meio ambiente são cada vez mais reconhecidos como importantes patógenos, pela frequência de doenças fúngicas sistêmicas graves, que têm aumentado nas últimas décadas. Considera-se tal fato como decorrente principalmente de condições que atingem o sistema imunológico, como agentes imunossupressores, transplantes de órgãos, quimioterapia, câncer, e outros fatores relevantes associados com o risco crescente de infecções fúngicas (Karkowska-Kuleta et al. 2009).

Em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS/SIDA) um percentual elevado desses indivíduos é acometido por algum tipo de micose como reflexo do comprometimento de seu sistema imunológico (González & Tobón 2006). Além de fatores relacionados ao hospedeiro, existem também determinadas condições associadas ao microrganismo que são muito importantes para que o fungo seja capaz de produzir infecção (Mitchelle & Perfect 1995).

A maioria dos patógenos incluindo as espécies do complexo *Cryptococcus neoformans* elabora uma variedade de prováveis fatores de virulência, e de estratégias específicas, que auxiliam sua habilidade de superar as defesas do hospedeiro estabelecendo a doença (Casadevall & Pirofski 2007; Kronstad 2007).

## 1.2 Criptococose

Criptococose é uma infecção aguda, subaguda ou crônica, de caráter sistêmico, que envolve pulmão, cérebro, ossos, podendo atingir diferentes órgãos do hospedeiro. Esta infecção ocorre após a inalação de propágulos em forma de leveduras ou basidiósporos presentes no meio ambiente, liberados por *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* espécies que atualmente compõem o complexo *Cryptococcus neoformans* (Eisenman et al. 2005; Kwon-Chung & Varma 2006). Relatos de infecção por outras espécies do gênero *Cryptococcus* principalmente *C. laurentii*, *C. albidus*, embora pouco comuns, têm aumentado nas últimas décadas (Mitchell & Perfect 1995; Khawcharoenporn et al. 2007).

No homem a doença pode ocorrer como uma infecção primária ou como oportunística. Esta última apresenta distribuição mundial sendo associada normalmente à condição de imunodepressão, cuja etiologia é relacionada à *C. neoformans*. A

criptococose primária é endêmica em áreas tropicais e subtropicais, ligada geralmente a hospedeiro imunocompetente, e tem como etiologia *C. gattii* (Idnurm et al. 2005; Subramanian & Mathai. 2005; Moretti et al. 2008; Santos et al. 2008; Costa et al. 2009).

Condições que alteram o sistema imune celular como AIDS/SIDA, câncer hematológico, transplante de órgãos sólidos, tratamento com imunossupressores, e fatores não relacionados diretamente ao sistema imunológico, como diabetes, alcoolismo e sarcoidose, contribuem para a invasão de *C. neoformans* e conseqüentemente para a instalação de criptococose (Perfect & Casadevall 2002; Pappalardo & Melhem 2003; Dromer et al. 2004; Tintelnot et al. 2004; Osuna et al. 2008).

Na década de 80, com o surgimento da AIDS, a criptococose aumentou drasticamente em nível mundial, tornando-se a mais relevante infecção oportunística fatal nos pacientes com AIDS, e em muitos casos é a primeira indicação da síndrome (Mitchell & Perfect 1995; Sivasangeetha et al. 2007). Globalmente, estima-se que aproximadamente 957.900 casos de meningite criptocócica ocorrem a cada ano, resultando em mais de 600.000 mortes. A região com o maior número de casos estimados em 2006 foi na África sub-sariana com 720.000 casos, seguido pelo Sul e Sudeste Asiático com 120.000 casos (Park et al. 2009). Nos Estados Unidos, Europa, Austrália e América do Sul a criptococose ocorre em 5 a 10% dos pacientes com AIDS (Bicanic & Harrison 2004).

A criptococose é descrita como doença definidora de AIDS (González & Tobón 2006), e tem sido relatada por Hazen e Howell em 45% dos pacientes com esta síndrome (Sivasangeetha et al. 2007). Em outros países como a França e Zâmbia, a criptococose atinge percentuais muito elevados nestes pacientes, sendo encontrada uma média de 74% e de 91%, respectivamente (Mwaba et al. 2001; Dromer et al. 2004).

No Brasil, conforme dados do Ministério da Saúde (2002), Pappalardo & Melhem (2003), relataram que de 215.810 casos de AIDS notificados no período de vinte anos (1980 a 2002), 6% dos pacientes apresentavam criptococose no momento da notificação. Vários trabalhos confirmam a interação entre essas patogenias, uma vez que a criptococose é frequentemente observada em pacientes com AIDS. No Rio Grande do Sul, foram registrados entre 2000 e 2005, 126 pacientes com meningite criptocócica, com 95% infectados pelo HIV (Leal et al. 2008). Em Goiânia, em pacientes com AIDS tem sido observada uma alta freqüência de meningite criptocócica (Fernandes et al. 2003, Souza et al. 2005). Lindenberg et al. (2008) em 123 casos de criptococose

diagnosticados entre 1995 e 2005 no Mato Grosso do Sul, verificaram em 84,9% associação com HIV. Em Cuiabá Estado de Mato Grosso, no período de 2005 a 2008, em 1.300 pacientes portadores de HIV/AIDS acometidos de micoses sistêmicas, 50% dos casos, tratava-se de criptococose (Ribeiro et al. 2009).

Em São Paulo, durante o ano de 2003, em 219 pacientes infectados pelo HIV apresentando doenças oportunistas do sistema nervoso central, 24% eram acometidos de meningite criptocócica (Vidal et al. 2008). De acordo com os sistemas oficiais de informação a respeito de meningite criptocócica do Rio de Janeiro, em 2002 a 2004 foram registrados 65,7% desta forma clínica sendo que aproximadamente 26% dos pacientes apresentavam AIDS/SIDA como doença preexistente mais frequente (Leimann & Koifman 2009).

A criptococose é considerada relativamente rara em crianças, com prevalência de 0,85 a 2,97% (Gonzalez et al. 1996; Abadi et al. 1999; Likasitwattanakul et al. 2004). Em determinadas regiões, no entanto a população infantil encontra-se bastante afetada. No Brasil, em Belém do Pará, Correa et al. (1999), verificaram uma incidência de 24,4% entre crianças e Darzé et al. (2000), na Bahia relataram resultados semelhantes de 30% de 104 casos ocorridos na população com menos de 15 anos. Em consequência da alta prevalência de criança infectada pelo HIV é provável que haja mudança nesse padrão (Subramanian & Mathai 2005).

A mortalidade por criptococose é estimada em 10% nos países desenvolvidos chegando a um percentual maior do que 40% nos países em desenvolvimento (Castañón-Olivares et al. 2000; Chen et al. 2000; Bicanic & Harrison 2004). No Brasil, de acordo com Pappalardo e Melhem (2003), a mortalidade em pacientes com criptococose atinge cerca de 45 a 65% na presença ou não de fatores predisponentes. No estado do Rio de Janeiro, a letalidade por meningite criptocócica foi cerca de 50% no período de 2000 a 2004 (Leimann & Koifman 2009). Além das condições do hospedeiro, o processo de invasão e de disseminação do fungo está intimamente relacionado a um complexo mecanismo de adaptação, seleção e virulência do microrganismo (Wormley & Perfect 2005).

### ***1.3 Complexo *Cryptococcus neoformans****

O complexo de espécies *Cryptococcus* é constituído por *C. neoformans* e *C. gattii* (Casadevall & Perfect, 1998; Kwon-Chung & Varma 2006; Satishchandra et al. 2007; Lindenberg et al. 2008). Ambas as espécies, taxonomicamente estão incluídas no Reino

Fungi, Filo Basidiomycota, Sub-Filo Agaricomycotina, Classe Tremellomycetes e Ordem Filobasidiales (Hibbett et al. 2007).

Estas leveduras são esféricas ou ovaladas encapsuladas de 2,5  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Buchanan & Murphy 1998). Possuem características morfológicas de célula eucariótica, com núcleo simples circundado por uma dupla membrana com poros e com nucléolo no seu interior. O citoplasma contém organelas, incluindo mitocôndrias, vacúolos, retículo endoplasmático liso e rugoso, ribossomos, grânulos de reserva contendo lipídios e glicogênio (Casadevall & Perfect 1998). Apresenta uma cápsula de polissacarídeo que é constituída por uma rede de microfibrilas. A produção de cápsula é uma característica que diferencia *C. neoformans* das demais leveduras de importância médica (Casadevall & Perfect 1998). A cápsula está intimamente associada à parede celular estrutura também essencialmente composta de polissacarídeos. A parede celular proporciona rigidez e a forma da célula, protege a mesma do estresse ambiental e lise osmótica regulando sua permeabilidade (Doering 2009). Os constituintes da célula de *C. neoformans* estão representados na Figura 1.

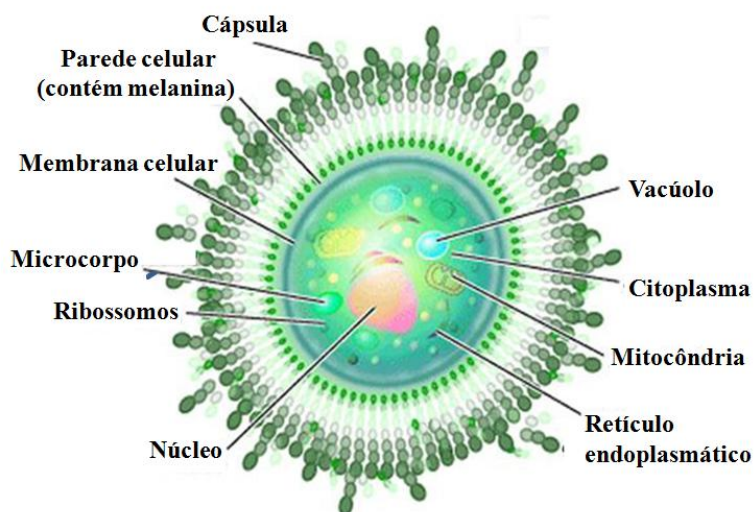


Figura 1. Representação esquemática da célula de *Cryptococcus neoformans*.

*C. neoformans* é isolado do solo, árvores, madeira em decomposição e de fezes de aves, principalmente de excrementos de pombos (Kobayashi et al. 2005; Baltazar & Ribeiro 2008; Lugarin et al. 2008; Costa et al. 2009). O isolamento do fungo em excretas de outras aves, como psitacídeo em zoológicos, em *pet shops* ou em residências onde vivem estes tipos de aves, sugere os excrementos destes como reservatórios ambientais importantes deste patógeno (Filiú et al. 2002; Abegg et al. 2006). As

excretas de aves são consideradas como um ambiente favorável ao crescimento dessas leveduras, pela grande quantidade de purinas, ácido úrico e creatinina, os quais são assimilados pelo fungo como fonte de nitrogênio (Casadevall & Perfect 1998). Há vários relatos de criptococose humana decorrentes provavelmente pelo contato com excretas de aves (Nosanchuk et al. 2000; Shrestha et al. 2004; Lagrou et al. 2005).

*C. gattii*, prevalece em regiões tropicais e subtropicais e tem seu habitat natural frequentemente associado à madeira em decomposição e a ocos de árvores como aquelas pertencentes a espécies de *Eucalyptus* sps, *Senna* sp, *Ficus microcarpa*, *Cedrus deodara*, *Acacia visca* e *Cassia grandis* (Halliday & Carter 2003; Kobayashi et al. 2005; Costa et al. 2009; Refojo et al. 2009). Embora mais encontrado em árvores, Kidd et al. (2007) sugerem que o solo pode ser o reservatório mais comum para *C. gattii*. Esta espécie é considerada endêmica no nordeste do Brasil, Paraguai, México, Austrália, em alguns países da África, Índia, sudeste da Ásia, Canadá e Estados Unidos no estado da Califórnia. Relatos de casos autóctones na Alemanha, Espanha, França e Itália também são mencionados (Nishikawa et al. 2003; Tintelnot et al. 2004, Colom et al. 2005; MacDougall et al. 2007).

Na fase anamórfica, as espécies de *Cryptococcus* produzem leveduras haplóides que se reproduzem assexuadamente por brotamento quando em vida parasitária ou ambiental, enquanto que na forma teleomórfica (forma filamentosa) podem se reproduzir sexuadamente, correspondendo ao estado perfeito do fungo sendo denominada de *Filobasidiella neoformans* e *Filobasidiella bacillispora* para *C. neoformans* e *C. gattii*, respectivamente (Kwong-Chung et al. 1976; Kwon-Chung & Bennett 1992). Os basidiósporos são fenotipicamente diferentes, sendo que em *F. neoformans* estes são esféricos, oblongos, elípticos ou cilíndricos com parede rugosa, enquanto que em *F. bacillispora* estes são elípticos com parede lisa (Casadevall & Perfect 1998).

Evidenciam-se dois tipos sexuais ou *mating-types*  $MAT\alpha$  e  $MATa$ , definidos por um locus com 2 alelos alternativos nesses microrganismos. O *locus mating-type* é a região do genoma fúngico que regula o ciclo sexual e pode ser diferente entre células de *mating-type* opostos, que ao se encontrar ocorre a reprodução sexuada, produzindo filamentos dicarióticos, ou seja, hifas que contém dois núcleos de origens diferentes (Kwon-Chung; Bennett, 1992). As hifas produzem basídios terminais subglobosos ou clavados, onde ocorre cariogamia, meiose, mitose. Após a germinação, as células haplóides formadas originam as leveduras (Know-Chung et al. 1992; Wickes et al.

1996; Lengeler et al. 2001). Estes tipos sexuais apresentam um importante papel na epidemiologia e virulência desse fungo. (Kwon-Chung et al. 1992; Ohkusu et al. 2002)

A fase anamórficas ou assexuada é encontrada normalmente na natureza. O ciclo assexuado dessa levedura pode ocorrer tanto em células que são *MATa* como nas células *MATa*. Na natureza a formação de corpos haplóides de frutificação tem sido mais frequentemente observada em células *MATa*. Neste tipo de reprodução, não há necessidade de cepas *mating-type* diferentes (Tschärke et al. 2003).

Espécies do complexo *C. neoformans* apresentam diferenças antigênicas na estrutura polissacarídica capsular, que permitem a identificação de cinco sorotipos: A, B, C, D e AD O sorotipo AD foi classificado como um híbrido diplóide dos sorotipos A e D (Ikeda et al. 1982; Nishikawa et al. 2003; Ikeda et al. 1985).

Estudos epidemiológicos, ecológicos, fenotípicos, fisiológicos e genéticos mostraram divergências significativas entre os sorotipos agrupando-os em variedades: *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A), *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) (Mitchell & Perfect 1995, Franzot et al. 1999; Boekhout et al. 2001; Lengeler et al. 2001; Xu & Mitchell 2003). Recentemente, foram descritos isolados clínicos identificados como híbridos BD, por apresentarem genótipos de *C. neoformans* e *C. gattii* simultaneamente (Bovers et al. 2008).

As diferenças genéticas entre as variedades permitiram a sua classificação em duas espécies distintas: *C. neoformans* e *C. gattii* diferindo também sob o ponto de vista epidemiológico e nicho ecológico (Kwon-Chung & Varma 2006).

O complexo *C. neoformans* foi caracterizado genotipicamente com base em diferentes métodos moleculares como PCR *fingerprinting*, RAPD (DNA Polimórfico Amplificado Aleatoriamente) RFLP (Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos de Restrição) e AFLP (Polimorfismo do Tamanho de Fragmentos Amplificados) em 9 tipos moleculares distintos representativos das variedades. VNI, VNII e VNB (sorotipo A, var. *grubii*), VNIII (sorotipo AD), VNIV (sorotipo D, var. *neoformans*), VGI, VGII e VGIII, VGIV sorotipos B e C respectivamente, ambos pertencentes á espécie *C. gattii* (Lin & Heitman 2006). Na Figura 2 encontra-se resumido as características do complexo *C. neoformans*.

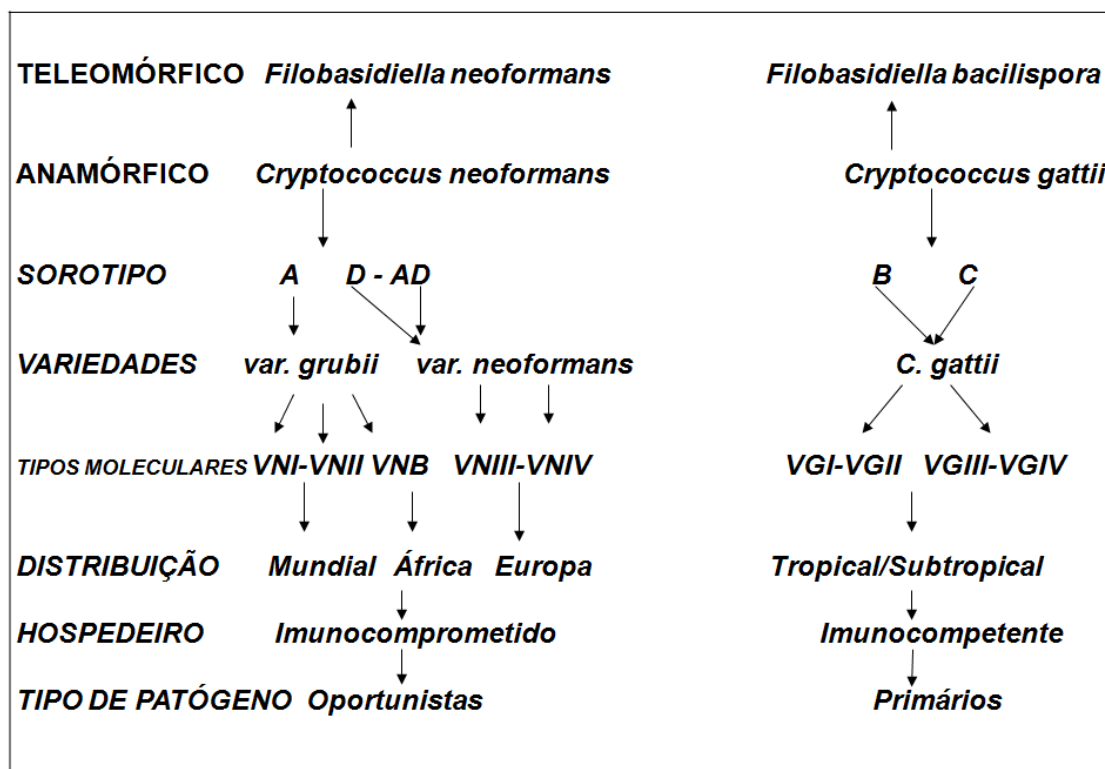


Figura 2. Características do complexo *Cryptococcus neoformans*. Adaptação: Lin & Heitman 2006; Nishikawa et al. 2003; Franzot et al. 1999; Kwon-Chung & Bennett, 1992

A distribuição das variedades do complexo está estreitamente correlacionada ao meio ambiente e aos isolados clínicos de criptococose (Blaschke-Hellmessen 2000; Litvintseva et al. 2005; Escandón et al. 2006). *C. neoformans* sorotipos A, D e AD, são geograficamente de ocorrência mundial, com maior frequência na Europa e América do Sul. O sorotipo A é largamente isolado do meio ambiente e responsável pelo maior número de infecções, correspondendo 99% dos casos em pacientes infectados pelo HIV (Litvintseva et al. 2005; Viviani et al. 2006). Na Colômbia, os sorotipos A e B, são frequentemente isolados de pacientes e do meio ambiente, verificando-se ausência do sorotipo AD neste país (Escandón et al. 2006).

Os sorotipos D e C são relatados na Europa, Ásia e em algumas regiões dos Estados Unidos como Nova Iorque e Califórnia, sendo considerados menos virulentos que os demais (Mitchell & Perfect 1995; Casadevall & Perfect 1998; Meyer et al. 2003; Nishikawa et al. 2003).

De acordo com Nishikawa et al. (2003) o sorotipo A é prevalente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil tanto em isolados clínicos como em ambientais. Nas regiões norte e nordeste há prevalência do sorotipo B. Resultados semelhantes foram obtidos por Souza (2006) em amostras clínicas e do meio ambiente da cidade de

Goiânia, GO, onde de um total de 124 isolados de *C. neoformans* 96,7% foram identificados como sorotipo A. Soares et al. (2005), em 30 isolados de *Cryptococcus* do meio ambiente da cidade de Santos, SP identificaram *C. neoformans* var. *grubii* em 43,3%. Outros pesquisadores também demonstraram predominância do sorotipo A em isolados clínicos, seguido pelo sorotipo B (Ohkusu et al. 2002; Fernandes et al. 2003; Igreja et al. 2004; Oliveira et al. 2004; Delgado et al. 2005; Abegg et al. 2006).

As espécies de *Cryptococcus* podem apresentar-se com diferentes características fenotípicas ou genotípicas que podem interferir na virulência do microrganismo, o que contribui na possível formação de variados tipos de lesões no hospedeiro.

#### **1.4 Fatores de Virulência**

*C. neoformans* possui fatores de virulência bem definidos, os quais são conhecidos por desempenhar funções importantes na sua patogenicidade uma vez que lhes permitem transpor as defesas do hospedeiro, sobreviver e causar doença (Hogan et al. 1996; Casadevall et al 2003; Steenbergen & Casadevall 2003). Vários desses fatores têm sido estudados em modelos de animais e identificados através de métodos bioquímicos e moleculares.

Crescimento a 37°C, a presença de cápsula polissacarídica, e habilidade de produzir melanina são os principais fatores de virulência, considerados essenciais para o estabelecimento da infecção e sobrevivência do fungo no hospedeiro (Casadevall & Perfect 1998; Idnurm et al. 2005). Outras características como produção de proteinase, fosfolipase, urease, manitol,  $\alpha$  mating type e superóxido dismutases, presentes nas leveduras do complexo *C. neoformans* também podem contribuir para sua virulência (Kwon-Chung et al. 1992; Casadevall & Perfect 1998; D'Souza & Heitman 2001; Steenbergen & Casadevall 2003; Perfect 2006; Dias et al. 2006; Plonkla & Grubacka, 2006; Waterman et al. 2007). Os principais fatores de virulência de *C. neoformans* relacionados ao meio ambiente e ao hospedeiro estão representados na Figura 3.

<b>Fatores de Virulência</b>	<b>Funções no Ambiente</b>	<b>Função na patogênese</b>
<b>37°C (5% CO<sub>2</sub>) (pH=7,3-7,4)</b>	<b>Sobreviver ambiente adverso</b>	<b>Infecção</b>
<b>Cápsula</b>	<b>Prevenção da dissecação Proteção contra predadores ameboides</b>	<b>Antifagocitário Imunomodulador</b>
<b>Melanina</b>	<b>Proteção: Temperaturas extremas e UV Predação microrganismos Ação de metais pesados</b>	<b>Reduz a fagocitose Antioxidante (radicais livres) Redução de suscetibilidade a antifúngicos</b>
<b>Fosfolipase</b>	<b>Proteção contra predadores</b>	<b>Auxilia na invasão tecidual Crescimento tecidual</b>
<b>Proteinase</b>	<b>Função nutricional</b>	<b>Lesão dos tecidos (invasão tecidual)</b>
<b>Urease</b>	<b>Aumento do pH microambiental</b>	<b>Sobrevivência no hospedeiro</b>

Figura 3. Alguns fatores de virulência de *C. neoformans* e sua relação com o meio ambiente e ao hospedeiro. Adaptação: Stennbegen & Casadevall 2003; Casadevall et al. 2003; van-Duin & Casadevall 2002

#### 1.4.1 Crescimento a 37°C

A capacidade de crescer e sobreviver à temperatura de 37°C, em uma atmosfera de aproximadamente 5% de CO<sub>2</sub>, e pH entre 7,3 a 7,4 é decisivo para o *C. neoformans* invadir o tecido e causar infecção (Buchanan & Murphy 1998).

O gene (*CNA1*) que codifica a subunidade catalítica A da proteína calcinerina, uma fosfatase serina/treonina específica que é ativada pela calmodulina cálcica (Ca<sup>2+</sup>), e está envolvido na resposta a diversos estímulos ambientais para adaptação do fungo a diferentes tipos de estresses, também está relacionado diretamente com a capacidade de sobrevivência desse microrganismo a 37°C (Odom 1997). A calcinerina é formada por um heterodímero composto pela subunidade catalítica A, e uma subunidade regulatória B (CNB1) (Fox et al. 2001).

Está comprovado, que isolados de *C. neoformans* cujo gene *CNA1* está ausente apresentam dificuldade de crescimento a 37°C e são incapazes de causar a morte ao serem inoculados em animais experimentais. A presença de calcineurina é, portanto determinante para o fungo sobreviver à temperatura do hospedeiro, o que se faz

necessário para sua patogenicidade (Buchanan & Murphy 1998; Cruz et al. 2001; Fox et al. 2001; Steinbach et al. 2007).

Estudos em animais têm confirmado a presença de pelo menos 20 genes envolvidos com a habilidade de sobrevivência do fungo como: *MPK1* que juntamente com a calcinerina promovem remodelamento da parede celular do fungo em condições de estresse em resposta a temperaturas elevadas. Este gene codifica a enzima MAP-kinase, envolvida na manutenção da integridade celular de *C. neoformans*; *CTS1* (*calcinerin temperature supressor*) codifica uma proteína que possui um domínio de ligação a fosfolipídios e um motivo zíper de leucina, e o rompimento desse gene resulta em sensibilidade a temperatura, inibindo o desenvolvimento de hifas e atenuando a virulência do fungo; *RAS1* codifica para proteínas capazes de hidrolisar GTP, estando envolvidas na regulação da estabilidade da forma filamentosa, *mating* e também na sobrevivência do fungo a temperaturas elevadas; *VPH1* (ATPase vacuolar), parece regular tanto a produção de melanina como a síntese da cápsula, assim como a capacidade de crescimento a 37°C; o gene *SOD2* codifica para uma proteína denominada  $Mn^{+2}$ -superóxido dismutase. Esta proteína é um antioxidante atuando contra as espécies reativas de oxigênio produzidas pelos sistemas de defesa do hospedeiro. As defesas antioxidantes de *C. neoformans* influenciam na sua habilidade de desenvolvimento a 37°C; *STE20* (serina/treonina quinase) e *CCNI* de *C. neoformans*, participam na adaptação do microrganismo a temperaturas elevadas (Alspaugh et al 2000; Erickson et al 2001; Wang et al, 2002; Chun et al. 2003; Kraus et al, 2003, Giles et al, 2005 ).

Outros genes como o *TPS1* e *TPS2* (trealose-6-fosfato sintase), *TSA* (thiol peroxidase), *SPE3-LYS9* (espermidina sintase-sacaropina desidrogenase), *ILV2* (acetolactato sintase), *MGA1*(*Monascus G-protein alpha-subunit*) são também responsáveis pela sobrevivência dos fungos submetidos ao estresse por exposição a altas temperaturas e, em especial ao ambiente do hospedeiro mamífero (Kraus et al. 2004; Perfect 2006).

#### 1.4.2 Cápsula

A cápsula é uma estrutura de processo dinâmico que sofre alterações em tamanho e reorganização durante seu processo de formação (McFadden 2006). Representa um dos mais importantes fatores de virulência de *C. neoformans*, possui relevantes propriedades antigênicas, sendo constituída principalmente de

polissacarídeos como glucuronoxilomanana (GXM), galactoxilomanana (GalXM) e algumas manoproteínas (Kwon-Chung & Rhodes 1986; Casadevall & Perfect 1998; Bose et al. 2003; Gates et al. 2004; Zaragoza et al. 2009).

Determinação molecular da massa de glucuronoxilomanana capsular de diferentes amostras de *C. neoformans* revelou que GXM é o maior polissacarídeo do microrganismo, com um peso molecular que varia entre 2000 e 4000 kDa, em alguns casos até 7000 kDa, e representa 85-95% da cápsula. Liberação de GXM que se acumula no tecido lesionado tem sido observada durante o processo infeccioso (McFadden et al. 2006; Zaragoza et al. 2008). Este composto apresenta ligações lineares de  $\alpha$  (1,3) manana, resíduos de  $\beta$  (1,2) ácido glucurônico, ligados a uma tríade de manose com ligações laterais de 6-O-acetil e um grupo de xilose  $\beta$  (1,2) ou  $\beta$  (1,4) laterais, que varia de acordo com o sorotipo, correspondente (Cherniak & Sundstrom 1994; Coenjaerts 2006; Klutts et al. 2007). Diferenças na estrutura dos componentes (manose, xilose e ácido glucurônico) de GXM caracterizam diferentes sorotipos dentro das espécies do complexo *Cryptococcus* denominados de A, B, C, D e o híbrido AD (Ikeda et al. 1985; Lengeler et al. 2001; Bose et al. 2003), conforme mostrado na Figura 4.

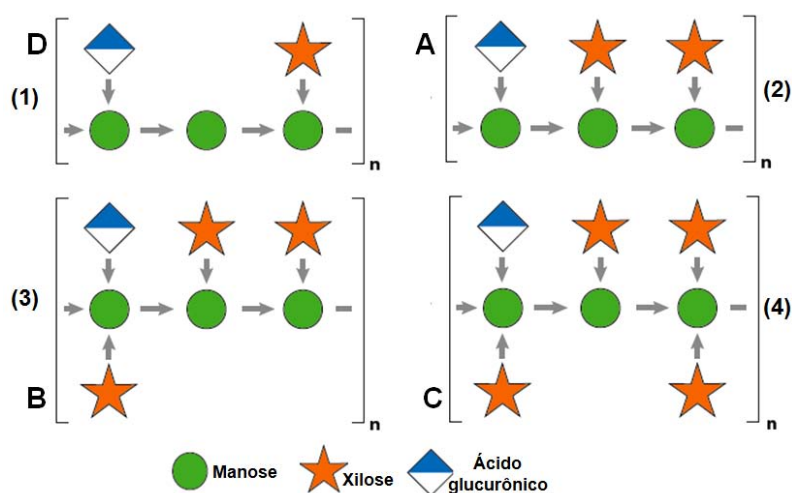


Figura 4. Unidades de Glucuronoxilomanana de *C. neoformans* caracterizando os diferentes sorotipos. (1) sorotipo D; (2) sorotipo A; (3) sorotipo B; (4) sorotipo C.

Galactoxilomanana, (GalXM) representa juntamente com algumas manoproteínas 5 a 12% da cápsula (Vaishnav et al. 1998; Zaragoza et al. 2008). GalXM é um polímero de  $\alpha$ -1,6-galactose (Gal) com  $\beta$ -1,3-galactose,  $\alpha$ -1,2-manose (Man), um número variável de resíduos de  $\alpha$ -1,4-xilose (Xil) e acetil com posição ainda não

bem definida (Janbon 2004). Os componentes de galactoxilomanana como ácido glucurônico, xilose, manose e galactose estão esquematizados na Figura 5.

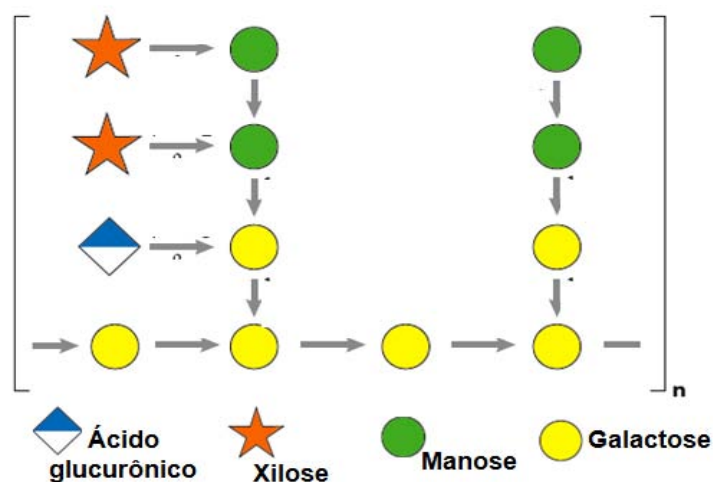


Figura 5. Localização dos diferentes componentes estruturais da Galactoxilomanana de *C. neoformans*.

A cápsula pode também incluir os membros da grande família de manoproteínas (MPs) compostos principalmente de manano e quantidades significativas de galactose e xilose (Cherniak & Sundstrom 1994). As MPs são heterogêneas em *C. neoformans*, e compartilham efeitos imunomoduladores. Duas MPs (MP1 e MP2) extraídas de *C. neoformans* são capazes de induzir o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) e a produção de IL-12 por monócitos humanos (Pietrella et al. 2005)

A síntese do GXM da cápsula ocorre dentro do citoplasma sendo exportado por vesículas. A secreção extracelular pode ser mediada pela parede, que permite o transporte destas vesículas. Assim, a síntese da cápsula parece estar associada com o acúmulo de vesículas na parede celular (van-Duin et al. 2004; Rodrigues et al. 2008; Doering 2009). A Figura 6 esquematiza a transposição da vesícula e liberação de GXM para a cápsula.

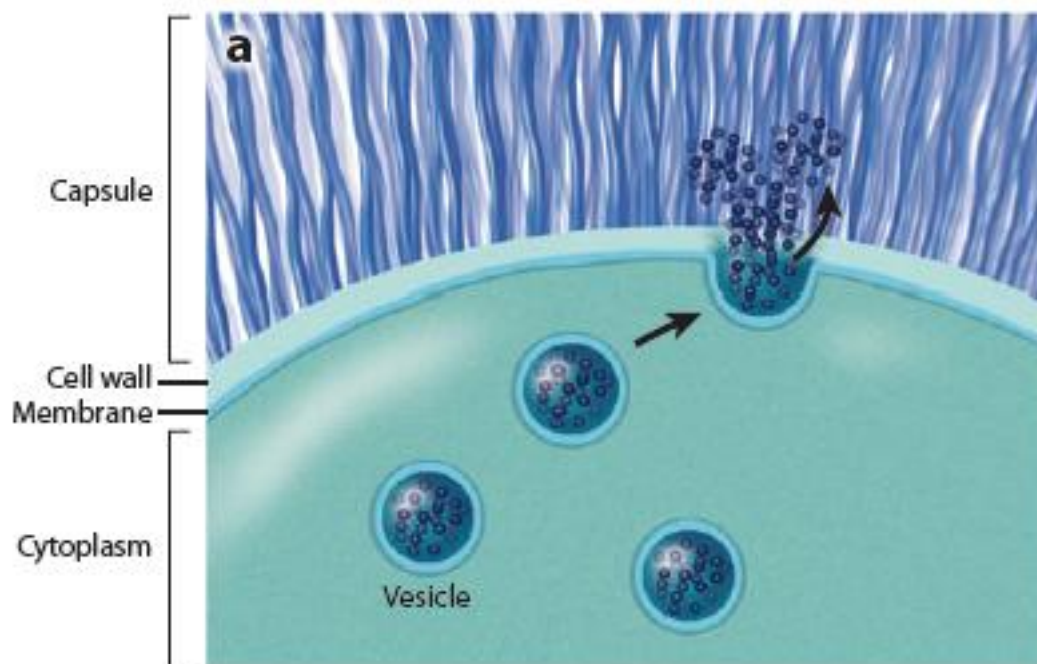


Figura 6. Vesículas contendo GXM formadas no citoplasma atravessando a parede celular para a cápsula (Doering 2009).

Os polissacarídeos capsulares de *C. neoformans* atuam no hospedeiro inibindo a fagocitose por células do sistema imunológico; impedem a migração dos leucócitos e neutrófilos, para o local da inflamação, interferem na apresentação de antígenos às células T, favorecendo a redução de citocinas como fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleucina 1 e 6 (IL-1 e 6) pelos monócitos e macrófagos e depletam a cascata do complemento (Casadevall & Perfect 1998; Ellerbroek et al. 2004; Pietrella et al. 2005). Por isso, a maior parte da atenção a essa estrutura celular, observados através de estudos imunológicos, têm consistentemente demonstrado seus inúmeros efeitos deletérios sobre a função imunológica do hospedeiro (McFadden 2006).

No meio ambiente, a cápsula protege a levedura da desidratação, reduz a sua ingestão por amebas existentes no solo, contribuindo para a sua sobrevivência em condições hostis (Steenbergen & Casadevall 2003; Idnurm et al. 2005; McFadden et al. 2006).

A cápsula possui porosidade variável, que aumenta com a distância da parede celular. A alta densidade da cápsula na sua porção interna evita a penetração de grandes moléculas para locais perto da parede celular, ao passo que, a superfície da cápsula, que realiza a interface com fagócitos, apresenta polissacarídeos capsulares com uma densidade muito baixa o que permite melhor plasticidade e permeabilidade às macromoléculas (Gates et al. 2004; Zaragoza & Casadevall 2004).

O tamanho da cápsula é determinado pelo genótipo do fungo e pelas condições de crescimento. Meios com pH inferior a 7,0 são capazes de inibir a indução de cápsula, enquanto que altas concentrações de CO<sub>2</sub> e baixas taxas de ferro favorecem o aumento da mesma. Com base nessas observações, o aumento da cápsuladurante a infecção no hospedeiro pode estar relacionado às altas concentrações de CO<sub>2</sub>, por exemplo, no pulmão e à baixa concentração de ferro nos tecidos (Casadevall & Perfect 1998; Zaragoza & Casadevall 2004; Frases et al. 2009).

Vários genes estão envolvidos na formação da cápsula, tais como *CAP* (*CAP10*, *CAP59*, *CAP60*, *CAP64* essenciais pra biosíntese de GXM), *MAN1*, *CAS* (*Cas1-Cas6* envolvidos na síntese dos polissacarídeos estando, portanto, associados à virulência) e *UXSI*, (Casadevall & Perfect 1998; Okabayashi et al. 2007), e deleção de alguns dos genes como o *CAP10*, o *CAP59*, o *CAP60* e o *CAP 64* resultaram em leveduras acapsuladas assim como também avirulentas, incapazes de produzir infecções (Chang & Kwon-Chung 1994; Moyrand et al. 1002) ). O gene *CAP60* é de grande importância, sendo essencial tanto para a formação da cápsula como para a virulência de *C. neoformans* (Chang & Kwon-Chung 1998).

### 1.4.3 Melanina

Melaninas são moléculas estáveis, carregadas negativamente, resistentes à degradação por ácidos, porém suscetíveis a bases fortes, insolúveis em água ou solventes orgânicos (Urán & Cano 2008). São macromoléculas sintetizadas por polimerização oxidativa de compostos fenólicos e classificadas em três grandes grupos: eumelanina de cor marrom ou negra insolúvel, sintetizadas a partir de um processo complexo de polimerização envolvendo quinonas e radicais livres (fenilalanina para dihidroxifenilalanina e dopaquinona) conforme a Figura 7; feomelanina de cor amarela ou vermelha, solúvel em álcool, que tem além da dihidroxifenilalanina (L-DOPA), a cisteína e tirosina incorporada durante a sua biossíntese, e alomelanina pigmento derivado de precursores livres de nitrogênio, geralmente de coloração negra ou marrom (Hamilton & Gomez 2002; Wakamatsu & Ito 2002; Plonka & Grabacka 2006; Urán & Cano 2008).

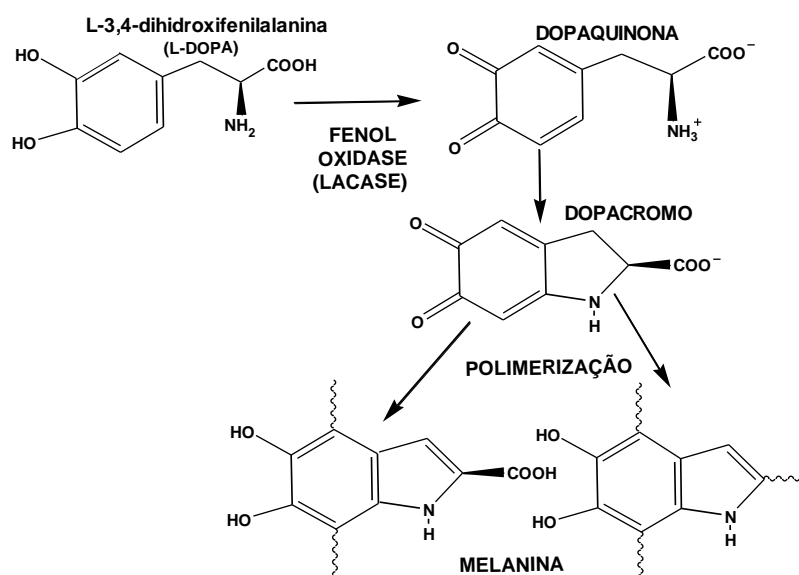


Figura 7. Síntese de melanina utilizando L-3,4-dihidroxi-fenilalanina como substrato.

Assim como a cápsula de polissacarídeos, a presença de melanina é essencial para a virulência de leveduras de *C. neoformans*. Microscopia eletrônica de varredura, e de transmissão e ressonância magnética nuclear mostram que melaninas isoladas destes fungos são partículas granuladas esféricas com aproximadamente 40-130 nm de diâmetro, distribuídas em várias camadas concêntricas, atingindo 75% da área da parede celular. Esta substância normalmente possui poros com diâmetros entre 1 a 4 nm e eventualmente 30 nm, os quais permitem a passagem de anticorpos e de pequenas moléculas, como glicose e aminoácidos. A ligação de anticorpos à melanina reduz o tamanho dos poros podendo explicar um possível mecanismo de inibição da ação de antifúngicos (Eisenman et al. 2005; Mandal et al. 2007).

A síntese e a localização de melanina em *C. neoformans* são fundamentais para a sua patogenicidade. Cepas não melanizadas são menos virulentas quando comparadas com cepas produtoras de melanina. A posição que a camada de melanina ocupa na célula é um fator importante na determinação da sua função, pois protege o organismo de várias agressões ambientais e permite o transporte de sais e outros componentes através da parede celular (Mandal et al. 2007).

Durante o processo infeccioso, a melanina interfere na formação da resposta efetiva mediada por células. Inoculação de melanina de *C. neoformans* em animais como camundongos pode estimular a produção de granulomas no processo de infecção (Mednick et al. 2005). Além disso, as células melanizadas são mais resistentes aos efeitos de determinados antifúngicos, como a anfotericina B e caspofungina e são

menos sensíveis a microbicidas oxidantes. Assim, a melanização influencia no processo de desenvolvimento da criptococose uma vez que o pigmento reduz a resposta de defesa do hospedeiro e a atividade terapêutica de alguns medicamentos (van-Duin et al. 2002; Ikeda et al. 2003; Mednick et al. 2005; Nosanchuk & Casadevall 2006; Mandal et al. 2007; Schiave et al. 2009).

No meio ambiente a melanização é importante para a sobrevivência do fungo, uma vez que protege este microrganismo de condições ambientais adversas, como temperaturas extremas, predação por microrganismos, radiação ultravioleta e ação de metais pesados. A melanina, portanto, tem um papel protetor para *C. neoformans*, no hospedeiro e no ambiente (Urán & Cano 2008).

A síntese de melanina pelo *C. neoformans* ocorre apenas na presença de compostos fenólicos, tais como L-3, 4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), metil-dopa, epinefrina e norepinefrina, catalisada por uma fenoloxidase, a lacase. O fungo capta precursores dopaminicos do ambiente extracelular que pode ocorrer tanto no meio ambiente como durante a infecção. *Cryptococcus neoformans* não é capaz de sintetizar estes precursores necessários para o processo da melanização (Nosanchuk & Casadevall 2003). O pigmento produzido no processo de melanização de *C. neoformans* depende do substrato utilizado no meio. Pigmentos produzidos a partir de *o*-difenois (grupos hidroxilas nas posições 2,3- ou 3,4-) são escuros e associados à parede celular, e os sintetizados a partir de *p*-difenois, (hidroxila nas posições 1,4- ou 2,5-), são solúveis e se espalham para o meio (Chaskes & Tyndall 1975).

A lacase é um importante fator de virulência para *C. neoformans*, se expressa como uma enzima da parede celular com um amplo espectro de atividade oxidante em compostos polifenólicos e diamínicos nas posições *orto*, *meta* e *para*, mas não em grupos monofenólicos, como fenol, tiramina ou a tirosina (Williamson 1994).

Dois genes presentes no fungo são responsáveis pela produção da lacase *LAC1* (previamente denominado *CNLAC1*) e *LAC2*, dos quais o primeiro expressa a atividade dominante da enzima sob condições reduzidas de glicose, e utiliza L-DOPA como substrato (Missal et al. 2005; Zhu & Williamson 2006). Os dois genes mostram estruturas muito semelhante entre os seus 14 éxons e possuem uma identidade de 76% nos nucleotídeos e de 72% nos aminoácidos codificados. A homologia dos genes é muito maior nas regiões de codificação da enzima do que nas regiões de regulação, sugerindo possíveis diferenças tanto na expressão como na regulação desses genes (Missal et al. 2005).

#### 1.4.4 Mating types

*Mating types* de *C. neoformans* tem sido bem documentado, entretanto pouco compreendido com relação à infecção. Há dois tipos de *mating types* descritos, mating type a (*MATa*) e  $\alpha$  (*MAT $\alpha$* ), sendo *MAT $\alpha$*  mais prevalentes tanto em isolados clínicos como no meio ambiente e provavelmente de maior virulência (Casadevall & Perfect 1998; Ohkusu et al. 2002; Mitchell 2003). Primers específicos para os genes *STE12* (*MAT $\alpha$* ), *STE20* (*MATa* e *MAT $\alpha$* ) tem permitido através do método de PCR, a determinação de *mating*, favorecendo assim uma melhor compreensão na epidemiologia destes microrganismos (Lengeler et al. 2001 Idnurm et al. 2005, Okabayashi et al. 2006

Estudos de virulência realizados em camundongos utilizando espécies de *C. neoformans*, com diferentes *mating types* confirmaram que *mating type  $\alpha$*  é mais virulenta do que a linhagem *mating type a*. O gene *STE12 $\alpha$*  presente em *mating type  $\alpha$*  regula a expressão do gene *CnLAC1* envolvido na formação da cápsula e na produção de melanina de *C. neoformans*. A deleção do gene *STE12 $\alpha$*  em algumas cepas torna estes mutantes menos virulentos (Kwon-Chung et al. 1992; Chang et al. 2000).

#### 1.4.5 Produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase

As proteinases participam na virulência dos microrganismos por degradar proteínas como colágeno, elastina e fibrinogênio, e outras proteínas imunologicamente importantes, como imunoglobulinas e fatores do complemento, levando ao comprometimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro. A degradação destas proteínas pode causar danos teciduais ou vasodilatação, fazendo com que ocorra a invasão e disseminação dos fungos nos tecidos do hospedeiro (Casadevall & Perfect 1998; Steenbergen & Casadevall 2003; Santagelo et al. 2004). Goldman et al. (1994), mostraram experimentalmente em ratos, que *C. neoformans* foi capaz de penetrar no parênquima pulmonar após ter sido inoculado no espaço alveolar, sugerindo a presença de substâncias tais como enzimas proteolíticas capazes de romper o tecido.

A fosfolipase está associada à virulência do fungo por desestabilizar as células através da hidrólise das ligações éster em glicerofosfolípídeos, presentes na bicamada lipídica da membrana, determinando a lise celular e desta forma permitindo a penetração do microrganismo nos tecidos do hospedeiro. Cepas altamente produtoras desta enzima possuem normalmente uma maior capacidade de aderência ao tecido do hospedeiro, processo que facilita a produção de lesões (Ghannoum 2000). Essa enzima

atua na camada externa da membrana celular e surfactantes dos pulmões, os quais são ricas em fosfolípidos, auxiliando o fungo na invasão tecidual (Cox et al. 2001).

A fosfolipase pode ter atividade de remoção de ambas às cadeias acil de glicerofosfolípidos sendo denominada fosfolipase B (PLB), de remover a cadeia acil de lisofosfolípidos sendo denominada lisofosfolipase (LPL) e ainda de reacetilar lisofosfolípidos denominando-se então de lisofosfolipase- transacilase (LPTA) (Wright et al. 2004; Djordevick et al. 2005).

## ***1.5 Tratamento da criptococose***

### **1.5.1 Antifúngicos**

Fungos causadores de infecções invasivas já conhecidas e novas espécies de fungos recentemente relatados têm surgido como responsáveis por lesões graves especialmente em pacientes imunocomprometidos. Antifúngicos com diferente espectro de atividade têm sido utilizados para a terapia destas infecções (Khan et al. 2006).

Os antifúngicos são agrupados de acordo com a sua composição química em:

1- Poliênicos (anfotericina B e nistatina) que interagem com ergosterol na membrana celular produzindo poros ou canais, que aumentam a permeabilidade da membrana, gerando uma grande perda de eletrólitos, principalmente potássio, determinando assim a lise e morte da célula (Groll & Kolve 2004);

2- Azólicos (fluconazol, itraconazol, cetoconazol e voriconazol) e outros, em desenvolvimento (posaconazol e ravuconazol), que inibem especificamente a biossíntese do ergosterol, principal constituinte da membrana citoplasmática, através do bloqueio da enzima 14- $\alpha$ -demetilase, presente no citocromo P-450 da célula fúngica (Sanglard 2002);

3- Alilaminas (terbinafina e natfina), que também interferem na biossíntese do ergosterol, mas através da inibição da enzima esqualeno epoxidase que também é responsável pela produção do ergosterol (Favre & Ryder 1996; Espinel-Ingroff 2008);

4- Derivados morfolínicos (amorolfina), que atuam bloqueando duas etapas sucessivas da biossíntese do ergosterol, mediadas pelas enzimas  $\Delta$ 14-redutase e  $\Delta^7$ - $\Delta^8$  isomerase (Favre & Ryder 1996);

5- Equinocandinas (caspofungina, anidulafungina e micafungina), antifúngicos inibidores específicos da síntese de polímeros de glucana, constituinte da parede celular fúngica. Estes antifúngicos inibem a ação da enzima  $\beta$ -1,3 glucano-sintase o que resulta em depleção de polímeros de glucano (Kurtz & Douglas 1997; Martinez 2006);



### 1.5.2 Mecanismos de Resistência

A ausência de uma resposta à terapia antifúngica pode estar relacionada à resistência do fungo ao agente antifúngico. Esta resistência pode ser intrínseca do microrganismo ou desenvolvida durante o processo de tratamento. As leveduras patogênicas podem apresentar estes dois tipos de resistência (Sanglard 2002; Espinel-Ingroff 2008).

Embora os mecanismos envolvidos no processo de resistência a antifúngicos ainda sejam pouco conhecidos, um dos principais mecanismos de resistência dos fungos, consiste na alteração da composição de lipídeos da sua membrana celular. O ergosterol presente como constituinte da membrana citoplasmática dá lugar a formação de outros esteróis (Sanglard 2002). Alterações na constituição de ergosterol, ou mesmo uma deficiência deste lipídio presente na membrana celular do fungo, tem sido associada a mecanismo de resistência à anfotericina B. Estas deficiências poderiam ser resultados de mutações nos genes que codificam algumas enzimas envolvidas na síntese do ergosterol. Defeitos no gene *ERG3* que codifica C-5-esterol desaturase (enzima que catalisa precursores do ergosterol) foram relatados por conduzir o acúmulo de outros esteróis precursores deste esterol (Espinel-Ingroff 2008). Kelly et al. (1994), relataram a associação no mecanismo de resistência a este antifúngico, à alteração na enzima  $\Delta^{8-7}$  isomerase, responsável pela incorporação do ergosterol no plasmalema da levedura.

Alteração na afinidade de azoles devido a mutações no gene *ERG11* que codifica a enzima do citocromo P450, lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase (Erg11), envolvida na via biossintética do ergosterol de células fúngicas, afetando a ligação destes antifúngicos à célula, é descrito, como um mecanismo de resistência dos fungos (Sanglard 2002; Rodero et al. 2003; Jarvis et al. 2007).

Além disso, o aumento da expressão dos genes *CDR* e *MDR1*, que codificam bombas de efluxo tem sido amplamente observado em leveduras resistentes ao azóis. Dois tipos de transportadores de efluxos foram relatados em isolados resistentes: transportadores de cassetes de ligação ao ATP “*Binding Cassette*” (ABC) que exporta grande variedade de azóis e outras substâncias não relacionadas, e os “Facilitadores Principais” (FP) responsáveis pelo baixo acúmulo dos antifúngicos azólicos nos isolados resistentes a esses fármacos. Nestes isolados, é demonstrada uma superexpressão do gene *CDR1*, ligado aos transportadores ABC e de *MDR1* ligado ao FP (Sanglard 2003).

Recentemente foi descrito em *C. neoformans* um gene denominado *AFRI* (*antifungal resistance 1*), que codifica um transportador ABC envolvido na resistência *in vitro* desse microrganismo ao fluconazol (Sanguinetti et al. 2006).

A resistência dos fungos aos antifúngicos pode ocorrer também devido a formação de biofilmes, que consistem em uma densa camada de células diferenciadas com uma capa de matriz extracelular, diminuindo a eficácia de alguns antifúngicos durante o processo de infecção (Martinez & Casadevall 2006).

Desta forma, o aumento de casos de criptococose associados à imunocomprometidos, os efeitos colaterais e as resistências observadas para os fármacos usados na terapia desta infecção, torna necessária a busca por novos agentes antifúngicos.

### **1.5.3 Plantas Medicinais e seus Produtos Naturais**

Diferentes espécies de plantas da flora brasileira são capazes de sintetizar substâncias com atividade antimicrobiana. O bioma cerrado, na região Centro-Oeste, apresenta grande diversidade taxonômica, com muitas espécies endêmicas, as quais são responsáveis pela produção de uma variedade de metabólitos que demonstram inibição do crescimento de fungos (Passos et al. 2002; Passos et al. 2003; Souza et al. 2003; Lemos et al. 2005).

Os trabalhos relacionados à atividade antimicrobiana de plantas tiveram início na década de 1940. Osborn, pesquisando a atividade de 2.300 plantas superiores em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* verificou que plantas pertencentes a 63 gêneros continham substâncias que inibiam o crescimento desses microrganismos (Sartori 2005). No Brasil, as pesquisas sobre substâncias antimicrobianas de origem vegetal tiveram início com Cardoso & Santos (1948), avaliando extratos de 100 diferentes plantas indicadas como antiinflamatórias ou cicatrizantes.

Os compostos produzidos pelos vegetais são agrupados em dois grupos: os metabólitos primários, tais como carboidratos, aminoácidos e lipídeos; e os metabólitos secundários que são compostos elaborados a partir da síntese dos metabólitos primários, tais como compostos fenólicos, terpenóides, óleos essenciais, alcalóides e flavonóides (Duarte 2006). A avaliação do potencial antimicrobiano de substâncias presentes em extratos e óleos essenciais (de caules, raízes, folhas e frutos), como consequência do metabolismo secundário, tem sido objeto de incessantes estudos (Maciel et al. 2002).

### 1.5.4 Plantas Medicinais do Cerrado

Considerado o país com a maior biodiversidade do mundo, o Brasil possui seis biomas ricos em espécies medicinais: Amazônia, Cerrado, Caatinga, Floresta Atlântica, Pantanal e Floresta Subtropical (Vieira & Martins 1998; Rehder et al. 2004). O cerrado é o segundo maior bioma brasileiro com uma área de aproximadamente dois milhões de km<sup>2</sup>, correspondendo a 24% do território nacional, superado em área apenas pela floresta Amazônica como mostra a Figura 9, e abriga uma imensa diversidade biológica (Ratter et al. 1997; Klink & Machado 2005).

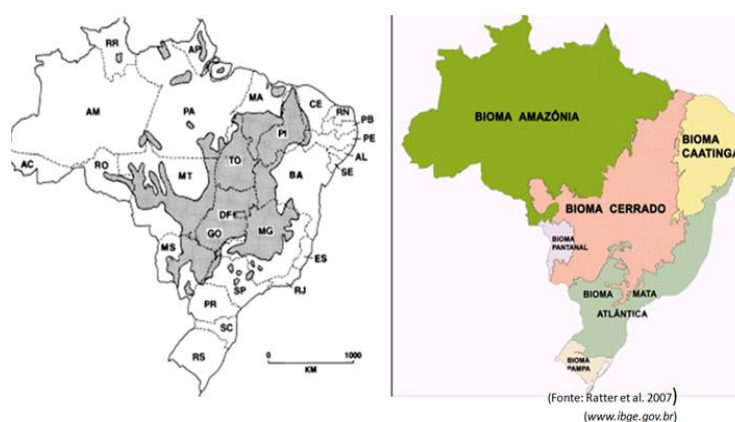


Figura 9. Distribuição do bioma brasileiro.

Já foram registradas no Cerrado brasileiro aproximadamente 10.000 espécies de plantas, 837 espécies de aves, 161 espécies de mamíferos, 150 espécies de anfíbios e 120 espécies de répteis (Myers et al. 2000; Silva & Bates 2002). Muitas plantas do cerrado brasileiro têm sido utilizadas na medicina popular no tratamento de várias doenças tropicais, incluindo esquistossomose, leishmaniose, malária, infecções fúngicas e bacterianas além de analgésicos, tranqüilizantes, diuréticos e laxativos (Lima et al. 1992; Almeida et al. 1998; Vieira & Martins 1998; Alves et al. 2000; Duarte et al. 2006; Domingues Souza & Felini 2006; Fener et al. 2006).

Prévios estudos foram realizados em nosso laboratório (Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Goiás) onde foi verificada a atividade antifúngica de plantas de diferentes famílias como Caryocaraceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Labiatae, Apocynaceae, annonaceae e seus componentes.

Importante espécie do gênero *Caryocar*, *Caryocar brasiliensis* Camb, planta da família Caryocaraceae, com nome popular pequi, bastante difundida em

decorrência do uso de seu fruto na culinária regional, é largamente utilizada como tonificante, no tratamento de bronquites, gripes, resfriados e como expectorante (Oliveira et al. 1968). Estudos *in vitro* têm demonstrado que o óleo essencial dessa planta foi capaz de inibir o crescimento de fungos causadores de doenças sistêmicas como *Paracoccidioides brasiliensis* e *C. neoformans* (Passos et al. 2002; Passos et al. 2003).

As plantas do gênero *Hyptis*, pertencente à família Lamiaceae, apresentam propriedades citotóxicas, antifúngicas, antirreumáticas, antiinflamatórias, anti-hepatotóxicas e antimaláricas (Yamagishi et al. 1988; Pereda-Miranda & Delgado 1990; Almtorp et al. 1991). Das substâncias isoladas de *Hyptis*, os lignóides foram identificados como os responsáveis pela atividade antitumoral e antimetabólica (Kingston et al. 1979); enquanto os compostos da classe dos flavonóides, apresentaram atividade antimicrobiana e citotóxica (Craveiro 1981). O óleo essencial de *H. suaveolens* possui atividade inibitória sobre bactérias e fungos da espécie *Candida albicans* (Asekum et al. 1999). Atividade antifúngica *in vitro* do extrato etanólico e óleo essencial de *H. ovalifolia* Benth. sobre *C. neoformans* e dermatófitos foi observada por Paula et al. (2001), Souza et al. (2002) e Souza et al. (2003).

*Ocimum gratissimum* L. conhecida por alfavaca, alfavacão, favacão, alfavaca-cravo, pertencente à família *Labiatae* (Vieira & Martins 1998), pode ser usado como antitérmico, antiparasitário, laxante, descongestionante nasal, no combate a infecções vaginais e contra queda de cabelo (Lima et al. 1992; Offiah & Chikwendu 1999). A atividade antifúngica do óleo essencial de eugenol de *O. gratissimum* contra fungos patogênicos como *C. neoformans* e dermatófitos foi demonstrada (Lemos et al. 2005; Silva et al. 2005).

*Annona crassiflora* Mart pertencente à família Annonaceae destaca-se pelo sabor de seus frutos, que são muito apreciados. Os frutos do araticunzeiro podem ser consumidos *in natura*, como também utilizados na fabricação de compotas, doces, geléias, sorvetes, sucos, licores e vinagres. Essa planta tem valor ornamental e medicinal, sendo sua semente empregada popularmente como antidiarreicas (sementes) e como antimicrobiana (Almeida 1998). Silva et al. (2001) demonstraram a atividade antifúngica *in vitro* do extrato da folha de *Annona crassiflora* contra *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*.

A família Myrtaceae compreende pelo menos 130 gêneros e aproximadamente 4.000 espécies de árvores e arbustos distribuídos por todos os continentes, com exceção

da Antártica, entretanto sua predominância ocorre em regiões tropicais e subtropicais. Constitui um dos mais importantes componentes da vegetação brasileira, tanto na estruturação das florestas como em outras formações nativas (Gressler et al. 2006).

Plantas do gênero *Eugenia*, pertencentes à família Myrtaceae têm seu uso medicinal baseado nos efeitos purgativos dos frutos, sendo a “garrafada” das folhas utilizadas como antidiarréicos e no combate a problemas cardíacos. É de conhecimento, que *E. uniflora* L. (pitanga) apresenta propriedades antimicrobianas contra dermatófitos e *Candida* spp (Adebajo et al. 1989; Schapoval et al. 1994; Souza 2002). Testes *in vitro* demonstraram atividade antifúngica do óleo das folhas de *E. dysenterica* D.C. (cagaita), que se mostrou capaz de inibir o crescimento de fungos como *C. neoformans* (Costa et al. 2000).

Com grande distribuição no Brasil, porém de ocorrência principalmente no cerrado, caatinga e floresta atlântica, *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum faz parte da família Myrtaceae, e é popularmente conhecida como craveiro-do-mato, louro-cravo ou chá-de-bugre. O óleo essencial obtido desta planta é constituído de hidrocarbonetos monoterpênicos e componentes com estrutura fenólica como eugenol e timol. Estes compostos atuam alterando a permeabilidade da membrana citoplasmática do microorganismo e inibindo enzimas da cadeia respiratória, interferindo no balanço energético da célula (Cunha, 2005). Lima et al. (2006), verificaram bons resultados de atividade de óleos essenciais, de *P. pseudocaryophyllus*, em *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus*.

Inúmeras aplicações, tais como aromatizantes na produção de perfumes, cosméticos e inseticidas, na indústria fármaco-medicinal por suas propriedades antimicrobiana, analgésica e sedativa têm sido atribuída a este componente da planta (Farias et al. 2009). As Folhas de *P. pseudocaryophyllus* podem ser utilizadas como infusão no tratamento de gripes, ou como condimento em doces e geléias, uma vez que apresentam o aroma e sabor característico e semelhante ao do cravo-da-índia (Limberger et al. 1998; Paula et al. 2005).

*P. pseudocaryophyllus* apresenta em sua constituição substâncias de composição química muito complexa originadas do metabolismo secundário da planta, destacando-se a presença de terpenos, fenilpropanóides, hidrocarbonetos, álcoois eugenol, metil-eugenol, taninos, flavonoides e traços de heterosídeos antraquinônicos, (Paula et al. 2005; Morais et al. 2006; Paula et al. 2008).

A atividade antimicrobiana atribuída aos flavonoides se deve à sua capacidade de interligar-se a proteínas da membrana celular do microrganismo causando a sua morte. Algumas hipóteses estão relacionadas ao mecanismo de ação concedido aos taninos, como a inibição de enzimas presentes nos fungos e bactérias; alteração no metabolismo da membrana celular do microrganismo e, a interligação dos taninos com íons metálicos, reduzindo a disponibilidade destes elementos considerados essenciais para o metabolismo do microrganismo (Scalbert, 1991).

### ***1.6 Testes de Suscetibilidade***

Infecções fúngicas recorrentes, longo tempo de terapia com antifúngicos promovendo efeitos colaterais e resistência de alguns fungos a diferentes antifúngicos, tornam evidente a necessidade de se realizar os testes de suscetibilidade *in vitro* para avaliar o comportamento desses microrganismos aos quimioterápicos disponíveis, na busca de uma terapia apropriada dessas infecções (Rex et al. 2001; Pfaller & Yu 2001; Ampel 2006).

Os métodos disponíveis para a realização dos testes de suscetibilidade aos antifúngicos consistem em adaptações executadas aos métodos antibacterianos. Recomenda-se o uso destes testes em situações específicas como resposta terapêutica não eficaz, para determinar uma alternativa de tratamento ou para verificar a presença de resistência a um fármaco (Dismukes 2000).

O *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI- 2002, 2008) denominado anteriormente National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) publicou uma série de documentos padronizando os testes de suscetibilidade *in vitro* para fungos, levando em consideração alguns parâmetros como: pH do meio, inóculo, período e temperatura de incubação, concentração dos antifúngicos e o critério de leitura do teste. O método aceito como referência para avaliar a suscetibilidade *in vitro*, é o de diluição em caldo preconizado pelo CLSI (2008) no documento M27A-3 para leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* e o documento M38-A, para fungos filamentosos, como *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp, *Pseudallescheria boydii*, *Sporotrix schenckii* e *Rhizopus* spp (CLSI 2002; CLSI 2008).

## 2 OBJETIVOS

Com base no exposto, este trabalho constou dos seguintes objetivos:

Avaliar em isolados de *C. neoformans* melanizados e não melanizados

1. Tamanho da cápsula e da parede celular
2. Atividade de fosfolipase
3. Suscetibilidade *in vitro* aos antifúngicos voriconazol, anfotericina B e ao extrato bruto da folha de *P. pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum
4. Atividade de voriconazol, anfotericina B e de *P. pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum, sobre a espessura da cápsula e da parede celular.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Microrganismos

Foram utilizadas 34 amostras de *C. neoformans*, obtidas do líquido céfalo-raquidiano (LCR) de pacientes com AIDS, provenientes do Hospital de Doenças Tropicais (HDT), na cidade de Goiânia, Goiás. As amostras foram identificadas segundo Kurtzman & Fell (1998), através de suas características macromorfológicas através do crescimento em ágar Sabouraud dextrose (ASD) e meio de di-hidroxi-fenilalanina (L-DOPA), micromorfológicas (formação de elementos arredondados com cápsula), fisiológicas (teste da produção de urease) e bioquímicas (assimilação de fontes de carbono), conforme esquematizado na Figura 10.

Cepas de *C. neoformans* ATCC 28957 sorotipo D e de *C. neoformans* ATCC 24065 sorotipo B foram utilizadas como controle. Todos os isolados foram armazenados a 4°C em ágar Sabouraud dextrose (Difco) e subcultivadas neste mesmo meio 72 horas antes da realização dos testes. Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do HDT, protocolo de n°. 004/03.

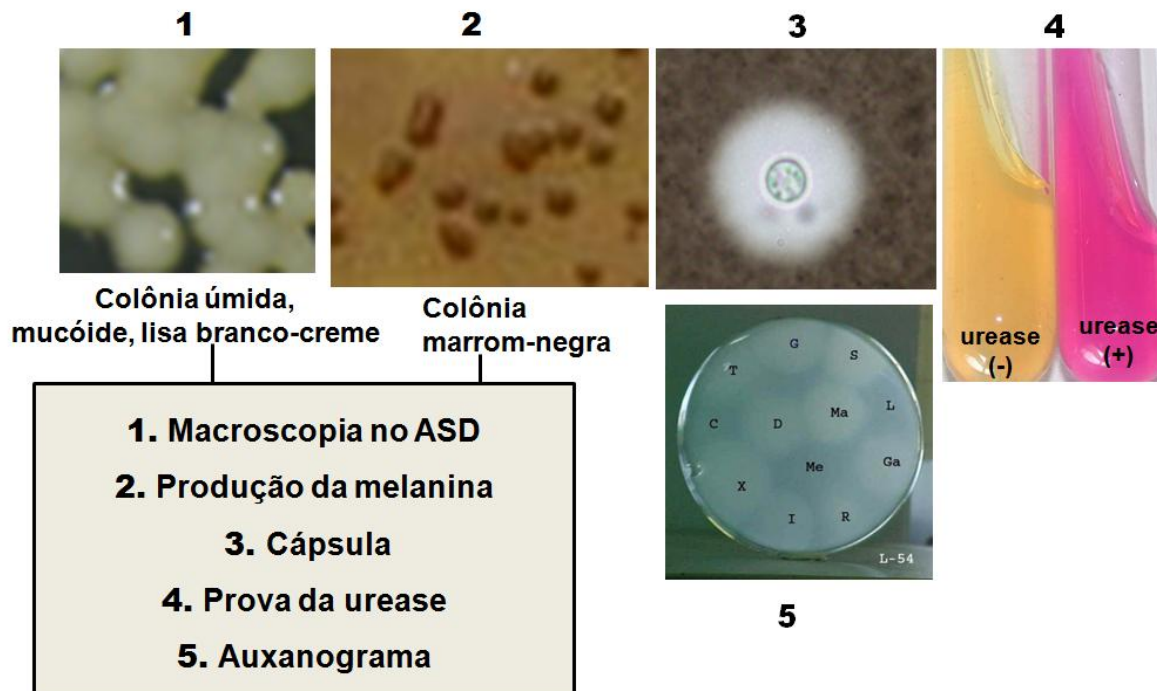


Figura 10. Aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos de *C. neoformans*.

### 3.2 Obtenção de células melanizadas e não melanizadas de *C. neoformans*

A melanização das amostras de *C. neoformans* foi realizada de acordo com van-Duin et al. (2004). Cada um dos 34 isolados foi cultivado por 24 horas a 30°C a 150 rpm em um meio, definido como meio mínimo, constituído de glicose 15 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 29,4 mM, glicina 13 mM e vitamina B 3 µM. Foi transferido 1 mL de cada amostra cultivada para o meio indutor de melanina [meio mínimo acrescido de di-hidroxi-fenilalanina 1mM (L-DOPA)] e incubada a 30°C por um período de 05 a 10 dias. Após este período, as células foram centrifugadas a 2000 rpm, lavadas em salina fosfatada tamponada (tampão PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) por 2 vezes e armazenadas neste tampão a temperatura de 4°C para posterior análise. Para a obtenção de células não melanizadas realizou-se o crescimento de *C. neoformans* em meio mínimo, sem adição de L-DOPA, sob as mesmas condições. A Figura 11 mostra o procedimento esquematizado.

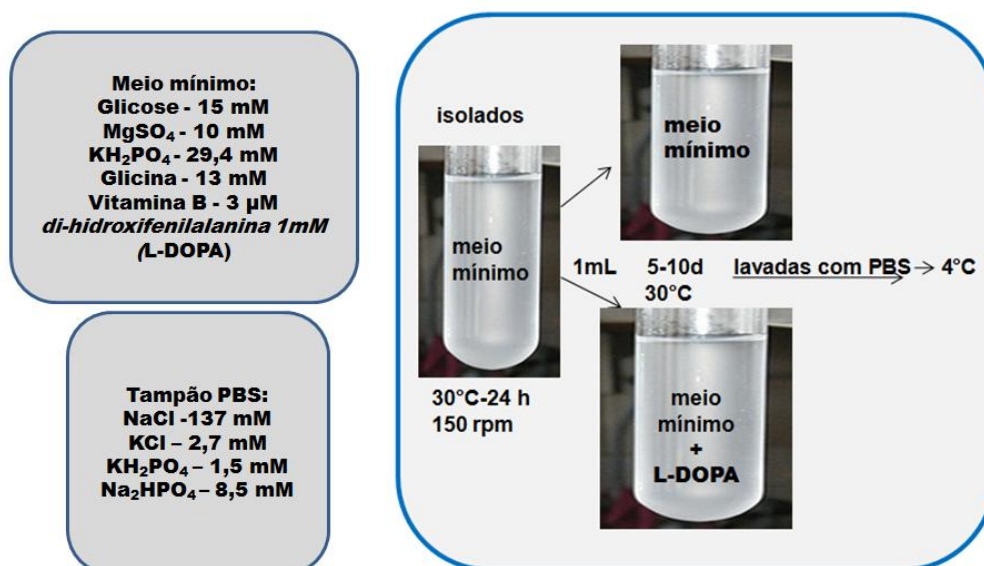


Figura 11. Obtenção de células de *C. neoformans* melanizadas e não melanizadas segundo van-Duin et al. (2004).

### 3.3 Produção de cápsula

A produção de cápsula por isolados de *C. neoformans* melanizados e não melanizados foi induzida em caldo Sabouraud diluído a 1:10 em tampão ácido morfolino propanosulfônico (MOPS) 50 mM, pH 7,3, segundo Zaragoza & Casadevall (2004). Brevemente, uma suspensão *C. neoformans* contendo 5 X 10<sup>6</sup> UFC/mL foi inoculada em tubos de ensaio contendo 3 mL de caldo Sabouraud adicionado de MOPS (meio para formação de cápsula) e incubados a 37°C por 24 horas. A formação da

cápsula, assim como a espessura da parede celular (1000X), foi observada em microscópio ótico comum Bino photo Nikon (Model Eclipse E-400) usando a técnica da tinta da China. Estas estruturas foram fotografadas através da câmera fotográfica Colpix-NIKON 995, sendo que o tamanho da cápsula e da parede celular foram medidas através do software de morfometria *image J* NIH. De cada isolado, foi analisado o tamanho da cápsula e da parede de 30 leveduras de *C. neoformans*, totalizando 1020 células melanizadas (34 isolados X 30 células) e 1020 células não melanizadas (34 isolados X 30 células). Assim, foi analisado um total de 2040 células. Na Figura 12 encontra-se o procedimento esquematizado

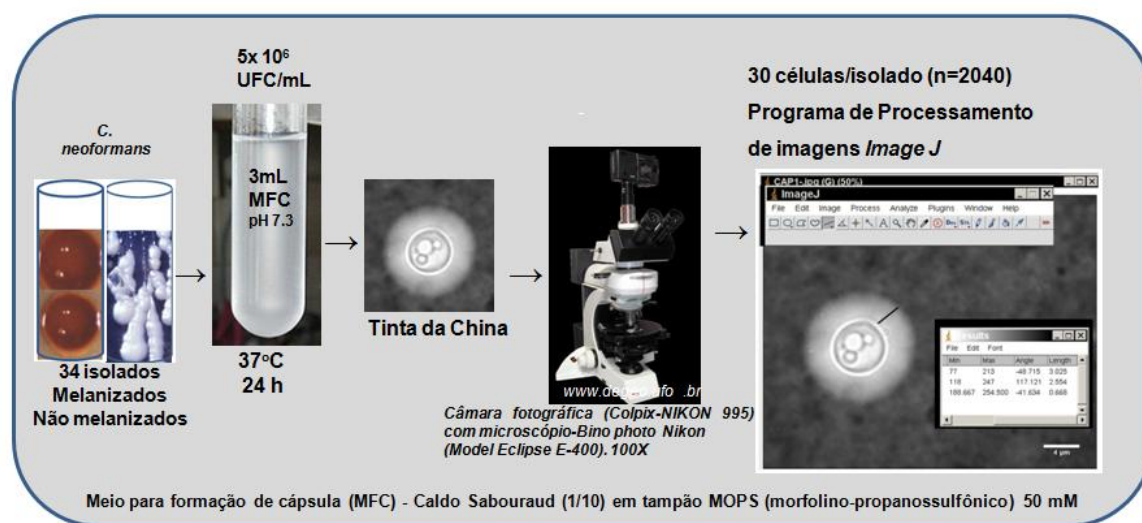


Figura 12. Procedimento para a produção de cápsula de *C. neoformans* (Zaragoza & Casadevall 2004) submetidos ou não à melanização e medição da espessura da cápsula e parede celular através de morfometria usando o programa *image J* NIH.

### 3.4 Avaliação da atividade de fosfolipase

A determinação da atividade de fosfolipase foi realizada segundo a técnica descrita por Price et al. (1982). Os isolados foram semeados (punctiforme) em placas de Petri contendo meio de ágar fosfolipase acrescido de emulsão de gema de ovo como fonte de fosfolipídios e incubados a 35°C por cinco dias. O experimento foi realizado em triplicata para cada isolado. A atividade da fosfolipase foi caracterizada pela presença do halo opaco ao redor da colônia (zona de precipitação), resultante da formação de complexo entre fosfolipídios degradados pela enzima e o cálcio presente no meio, conforme mostrado na figura 13. A atividade enzimática (Pz) foi medida através da fórmula  $Dc/Dc+Dcp$ , onde Dc corresponde ao diâmetro da colônia e Dc+Dcp corresponde ao diâmetro da colônia somado à zona de precipitação. Os resultados foram

considerados da seguinte forma:  $Pz = 1,0$  significa ausência de atividade enzimática;  $0,64 < Pz < 1,0$  significa presença de atividade enzimática e  $Pz < 0,64$  significa atividade enzimática fortemente positiva. Foi utilizada como controle positivo para o teste uma cepa padrão *Candida albicans* ATCC 28367.

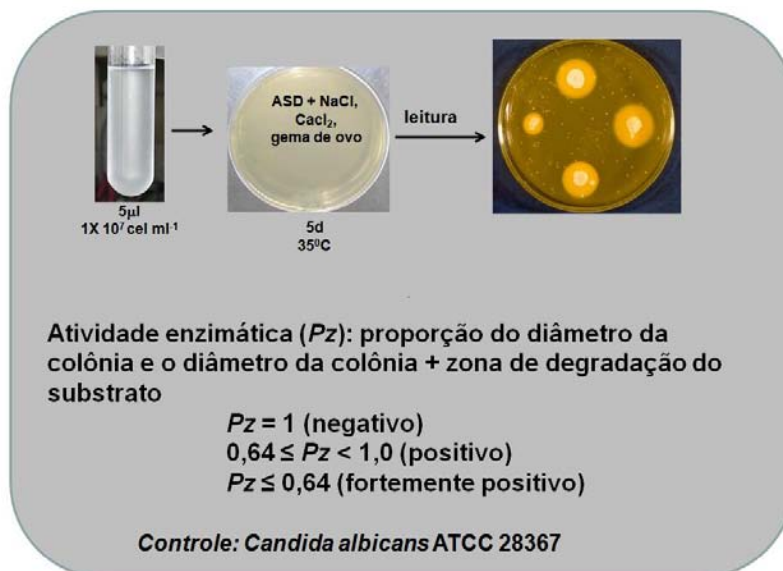


Figura 13. Esquema da avaliação da produção de fosfolipase segundo Price et al. (1982).

### 3.5 Teste de suscetibilidade *in vitro*

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

A suscetibilidade *in vitro* de 34 isolados de *C. neoformans* melanizados e não melanizados foi determinada para voriconazol, anfotericina B e para o extrato bruto da folha da planta *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum. Este extrato foi preparado e gentilmente cedido pelo Prof. Dr. José Realino do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Farmácia da UFG. O teste de suscetibilidade *in vitro* usando a técnica de microdiluição em caldo foi realizado de acordo com os documentos M27-A3 e M27S3 do CLSI (2008) que permite determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do antifúngico.

Voriconazol (Pfizer International, New York, NY), anfotericina B (Squibb, USA) e o extrato da planta foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO). Diluídos ao dobro em caldo RPMI 1640 (Sigma Chemical Co) sem bicarbonato de sódio tamponado a pH 7,0 com ácido morfolino-propanossulfônico (MOPS; Sigma Chemical

Co), de tal modo que as concentrações variaram de 32 a 0,06  $\mu\text{g/mL}$  para voriconazol e anfotericina B e de 1024 a 2  $\mu\text{g/mL}$  para o extrato de *P. pseudocaryophyllus*.

### 3.5.2 Preparação do inóculo

A suspensão dos isolados de *C. neoformans* foi realizada em solução salina estéril (0,85%), ajustada em espectrofotômetro para uma transmitância de aproximadamente 85%, em um comprimento de onda de 530 nm, que equivale a aproximadamente 1 a  $5 \times 10^6$  UFC/mL. Em seguida, a suspensão contendo o inóculo foi diluída a 1:50 e 1:20 em caldo RPMI 1640 de tal modo que se obtivesse uma concentração final de 0,5 a  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL.

### 3.5.3 Procedimento do teste

Foram utilizadas placas de microtitulação contendo 96 poços, nos quais a cada poço, foram colocados 100  $\mu\text{L}$  do agente antifúngico e 100  $\mu\text{L}$  do inóculo. Controles do agente antifúngico, do inóculo e meio de cultura (RPMI 1640) foram realizados em cada teste. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. A Figura 14 esquematiza a execução do teste de suscetibilidade *in vitro*.

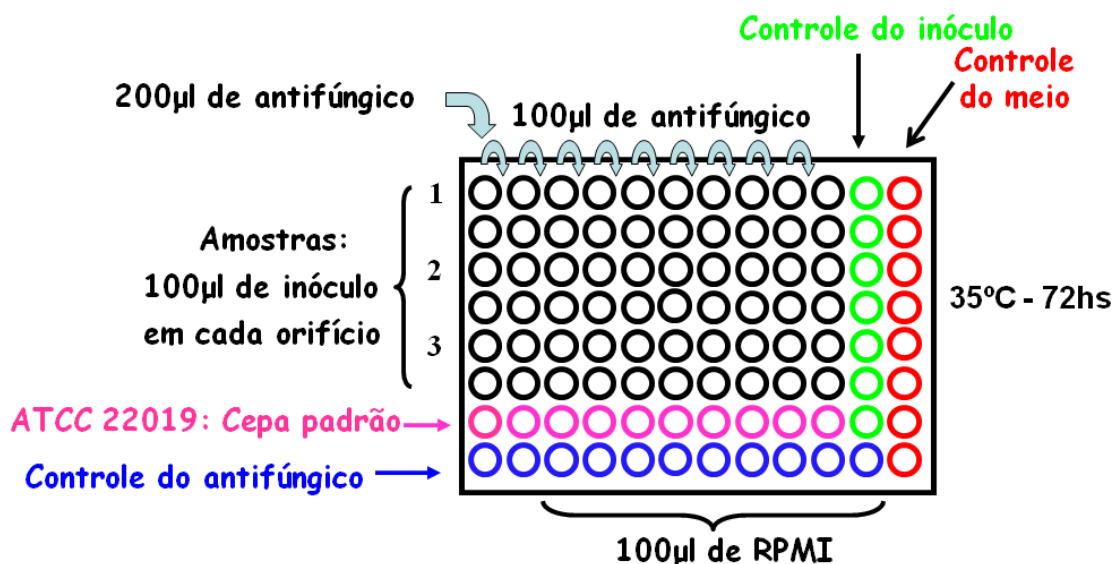


Figura 14. Placa de microtitulação esquematizando o teste de suscetibilidade *in vitro* pelo método de microdiluição em caldo.

### 3.5.4 Incubação e leitura

As placas de microdiluição foram incubadas em estufa a 35°C, e a leitura da CIM foi feita a olho nu após 72 horas. Para voriconazol, a CIM foi considerada como a concentração que apresentou 50% de inibição comparada ao controle do inóculo e para anfotericina B e o extrato de *P. pseudocaryophyllus*, uma inibição de total de crescimento.

### 3.5.5 Controle de qualidade

Em todos os testes realizados foi incluído *Candida parapsilosis* ATCC 22019 como controle.

### 3.5.6 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

A determinação da CFM dos 34 isolados de *C. neoformans* melanizados e não melanizados foi realizada semeando-se 100µl de cada amostras na CIM e duas concentrações superiores de voriconazol, anfotericina B e do extrato bruto da planta (*P. pseudocaryophyllus*) obtido no teste de suscetibilidade. A leitura foi realizada após incubação de 72 horas, a 35°C, sendo considerada a CFM a concentração onde houve inibição total de crescimento do fungo ou no máximo de até uma colônia (Figura 15). Todos os testes foram realizados em duplicata.

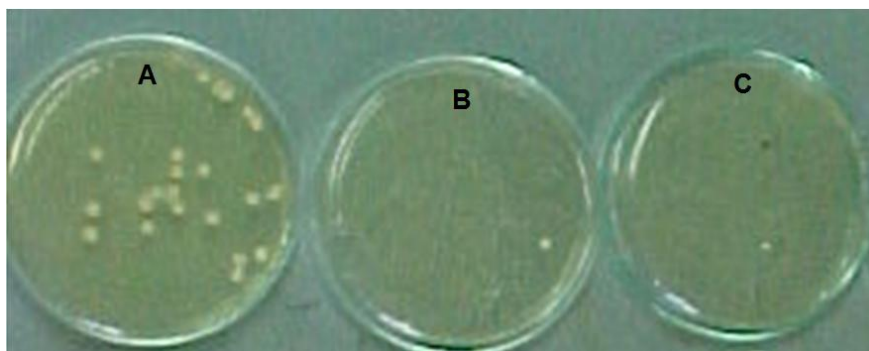


Figura 15. Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) de voriconazol em meio de ágar Sabouraud dextrose. (A)-CIM, (B)-2X CIM, (C)-4X CIM.

### 3.5.7 Ação de voriconazol, anfotericina B e do extrato de *P. pseudocaryophyllus* sobre a cápsula e parede celular de *C. neoformans* melanizados e não melanizados

### 3.5.7.1 Inóculo

Foram utilizadas seis amostras de *C. neoformans* melanizados e não melanizados. A suspensão de cada isolado foi realizada em solução salina, a uma concentração de  $2,2 \times 10^6$  cels/mL. Estas células foram contadas em câmara de Neubauer.

### 3.5.7.2 Preparo dos antifúngicos e do extrato da planta

Os fármacos e o extrato da planta foram solubilizados em DMSO e diluídos em concentrações equivalentes a 1/2 CIM obtida pela técnica de microdiluição em caldo para cada um destes isolados.

### 3.5.7.3 Procedimento do teste

Uma alíquota de 0,9 mL da suspensão fúngica de cada isolado foi adicionada a 0,1 mL dos antifúngicos e do extrato de planta, obtendo-se uma concentração para anfotericina B e voriconazol de 0,062  $\mu\text{g/mL}$  (1/2 CIM dos antifúngicos encontrada para os seis isolados) e para o extrato da planta de 32  $\mu\text{g/mL}$  (1/2 CIM de *P. pseudocaryophyllus* encontrada para os seis isolados).

Esta mistura (suspensão fúngica + composto) foi colocada em meio de caldo Sabouraud dextrose, acrescido de MOPS (50 mM) que favorece a produção da cápsula. Após incubação a 37°C, durante um período de 24 horas, as células foram retiradas, preparadas com tinta da China e visualizadas à microscopia óptica comum com objetiva de imersão.

### 3.5.7.4 Controle

Foram usados como controle, isolados melanizados e não melanizados sem adição de antifúngicos e de extratos.

### 3.5.7.5 Análise do tamanho da cápsula e da parede

Cápsula e parede de *C. neoformans* foram fotografadas por câmera fotográfica (Colpix-NIKON 995) acoplada a um microscópio- Bino photo Nikon (Model Eclipse E-400), usando objetiva de imersão, sendo que o tamanho da cápsula e da parede foi medido pelo software de morfometria *Image J* (NIH). A medida destas estruturas da célula obtida foi realizada pela análise de 30 células de cada isolado de *C. neoformans*, o qual foi analisado estatisticamente usando-se a mediana destes valores.

A Figura 16 mostra as etapas que foram seguidas para obtenção das medidas da cápsula e da parede de *C. neoformans* sob a ação de extrato da planta e de antifúngicos.

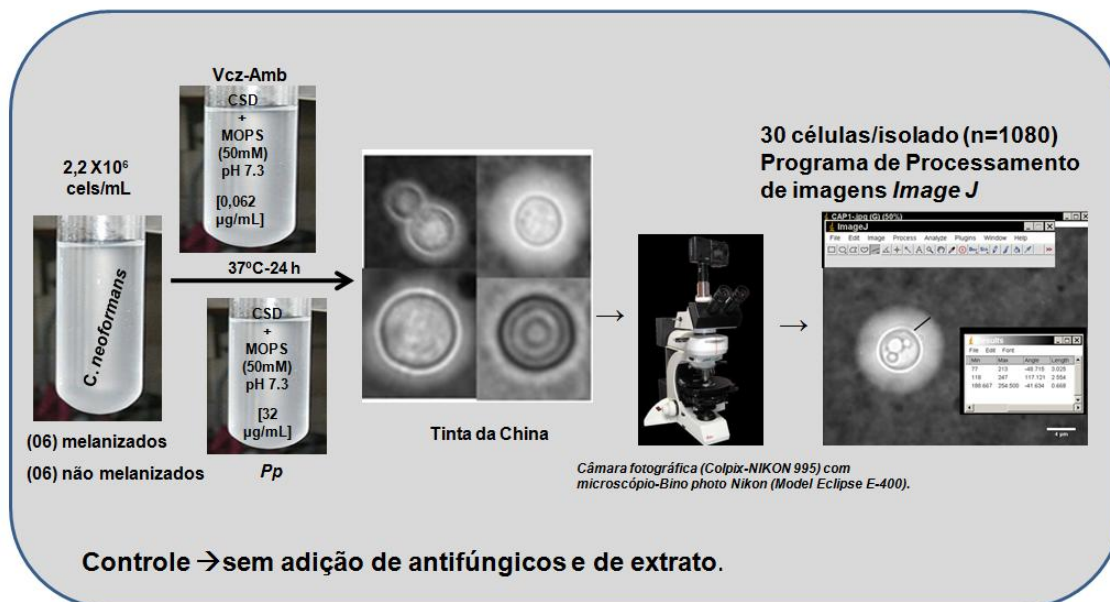


Figura 16. Etapas experimentais para a medida da cápsula e da parede de *C. neoformans* sob a ação de voriconazol (Vcz), anfotericina B (Amb) e extrato de *P. pseudocaryophyllus* (Pp) em meio de caldo Sabouraud dextrose (CSD) adicionado de ácido morfolino-propanossulfônico (MOPS).

### 3.5.7.6 Análise estatística

A análise estatística da atividade de antifúngicos e da planta sobre o tamanho da parede e da cápsula de isolados de *C. neoformans* melanizados e não melanizados foi realizada através dos testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney usando o *software Sigma Stat* versão 3.2. Foi considerado estatisticamente significante valores de  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Melanização

Todos os fungos submetidos ao meio mínimo com L-DOPA tornaram-se melanizados entre o 3º e 5º dia de crescimento, através da mudança de coloração do meio de cultura contendo colônias fúngicas, que se tornaram escuras. Foi observado que com o crescimento do fungo havia a produção de uma cor mais intensa no meio (Figura 17).

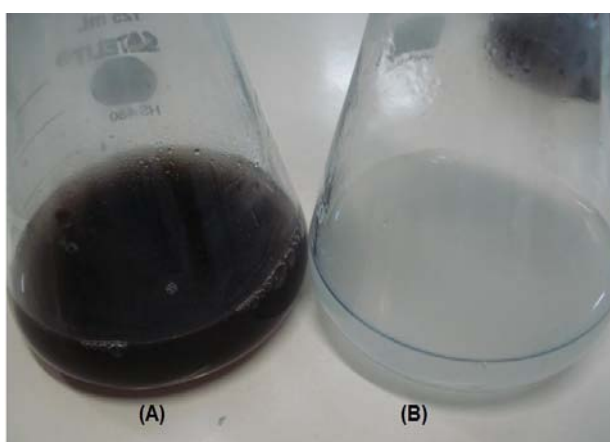


Figura 17. Celulas de *C. neoformans* com cinco dias de crescimento. (A) Meio indutor de melanina: meio mínimo com L-DOPA. (B) Meio não indutor: meio mínimo sem L-DOPA.

### 4.2 Espessura da cápsula e parede

A medida do diâmetro da cápsula de *C. neoformans* mostrou variação de 1,20  $\mu\text{m}$  a 1,90  $\mu\text{m}$  para os isolados melanizados e de 2,63  $\mu\text{m}$  a 5,12  $\mu\text{m}$  para os não melanizados quando cultivados em meio indutor de cápsula. A espessura da cápsula de 34 isolados de *C. neoformans* mostrou-se maior ( $p < 0,05$ ) em isolados não melanizados. Ao contrário do encontrado para a cápsula, a medida da espessura da parede celular foi maior ( $p < 0,05$ ) em isolados melanizados, variando de 0,80  $\mu\text{m}$  a 1,09, e de 0,41  $\mu\text{m}$  a 0,49  $\mu\text{m}$  para os não melanizados quando cultivados em meio de caldo Sabouraud acrescido de MOPS. A espessura da cápsula e parede de células melanizados e não melanizados de *C. neoformans* é mostrado na Figura 18,

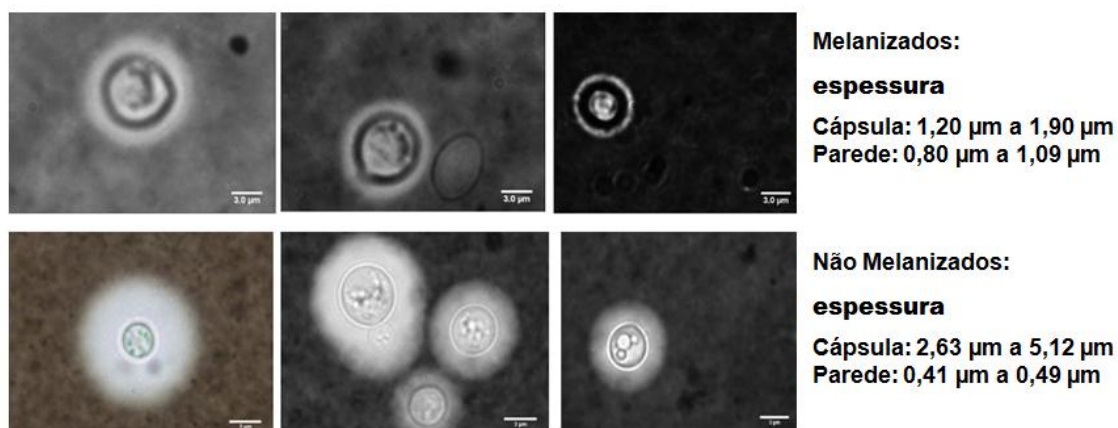


Figura 18. Fotomicrografia da cápsula e da parede celular de *C. neoformans* melanizados e não melanizados utilizando tinta da China. (Escala= 3 $\mu\text{m}$ ).

A mediana da espessura da cápsula foi de 1,52  $\mu\text{m}$  para os melanizados e 3,54  $\mu\text{m}$  para os não melanizados enquanto para a parede a espessura foi de 0,98  $\mu\text{m}$  para os melanizados e de 0,42 $\mu\text{m}$  para os não melanizados (Figura 19). A análise estatística de comparação entre a espessura da cápsula e da parede mostrou variação estatisticamente significativa entre os isolados melanizados e não melanizados ( $p < 0,05$ ).

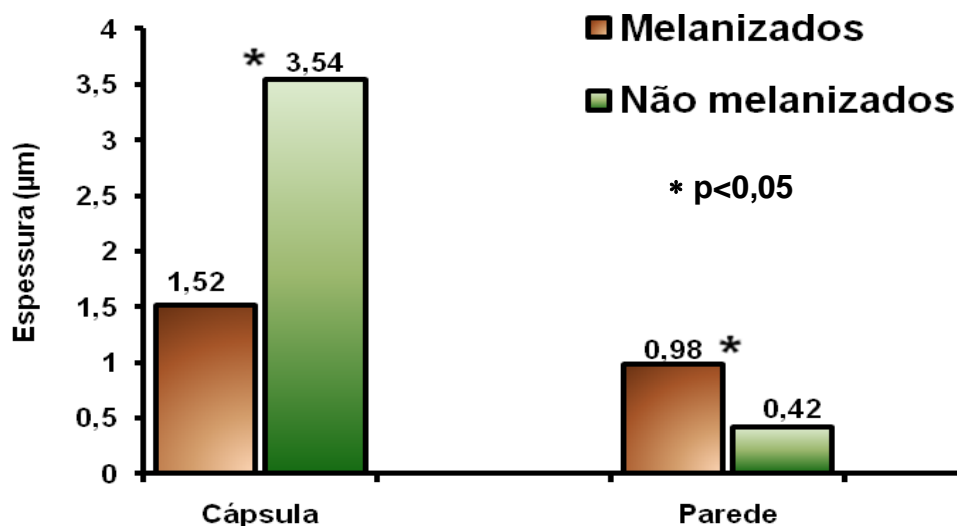


Figura 19. Mediana da espessura da cápsula e da parede de isolados de *C. neoformans* melanizados e não melanizados (n=1020)

### 4.3 Avaliação da atividade de fosfolipase

Todos os isolados de *C. neoformans* foram capazes de produzir fosfolipase. Os isolados melanizados demonstraram-se fortemente ativos com valores de  $P < 0,64$  em 85,3%, enquanto os não melanizados esta atividade foi evidenciada em 79,5% das amostras (Figura 20).

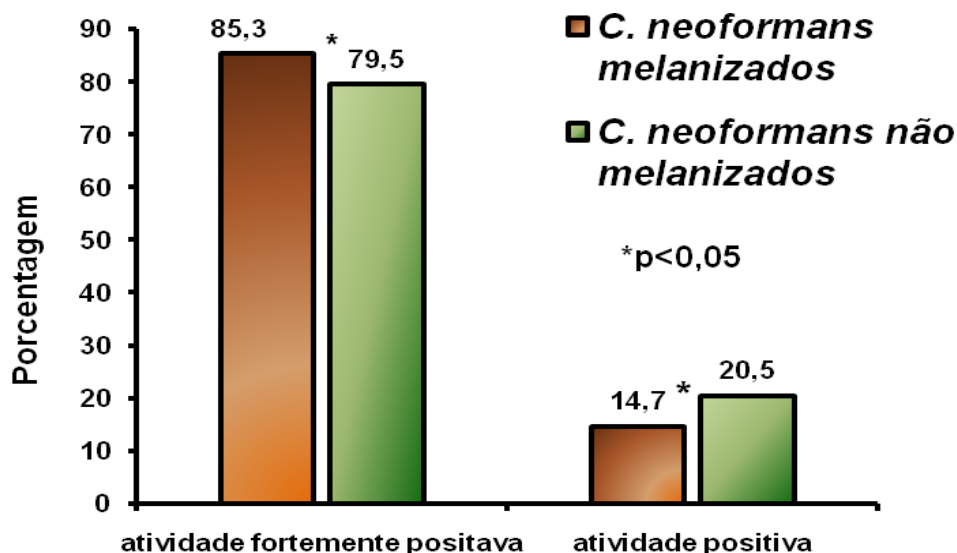


Figura 20. Atividade enzimática dos isolados (%) de *C. neoformans* melanizados e não melanizados. Atividade fortemente positiva =  $Pz < 0,64$  positiva e atividade positiva =  $Pz > 0,64$

### 4.4 Teste de suscetibilidade in vitro

Os resultados de suscetibilidade aos antifúngicos e ao extrato bruto de *P. pseudocaryophyllus* foram muito semelhantes entre os isolados de *C. neoformans* melanizados e não melanizados. A CIM apresentada para os antifúngicos foi geralmente baixa tanto para voriconazol quanto para anfotericina B. A variação de CIM para voriconazol foi de 0,062 a 0,125  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto para anfotericina B foi de 0,125-0,5  $\mu\text{g/mL}$  para *C. neoformans* melanizados e para os não melanizados. O extrato da planta mostrou valores de CIM variando de 64 a 128  $\mu\text{g/mL}$  tanto para os isolados melanizados como para os não melanizados.

A análise da CFM dos antifúngicos e do extrato da planta mostrou valores de 2 a 8 vezes superiores aos encontrados para CIM. No entanto a comparação de CFM de voriconazol e de *P. pseudocaryophyllus* entre isolados melanizados e não melanizados não mostrou diferenças. Com anfotericina B, a CFM para isolados melanizados foi 8 vezes superior a CFM encontrada para os não melanizados. As CFMs de anfotericina B

variaram de 1-4 µg/mL para isolados de *C. neoformans* melanizados e de 0,125-0,5 µg/mL para os não melanizados. Os resultados da variação de CIM, da concentração capaz de inibir 50% dos isolados (CIM50), da concentração capaz de inibir 90% dos isolados (CIM90) e a CFM dos antifúngicos e do extrato bruto da folha de *P. pseudocaryophyllus* para os isolados de *C. neoformans*, melanizados e não melanizados são mostrados na Tabela 1.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima e fungicida (µg/mL) de voriconazol, anfotericina B e extrato bruto da folha de *P. pseudocaryophyllus* para *C. neoformans* melanizados e não melanizados.

<i>C. neoformans</i>	Antifúngicos	Variação de CIM	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	Variação da CFM
<b>Melanizados</b>	Voriconazol	0,062-0,125	0,062	0,125	0,125-0,5
	Anfotericina B	0,125-0,5	0,25	0,5	1-4
	<i>P.pseudo-caryophyllus</i>	64-128	64	128	128≥512
<b>Não Melanizados</b>	Voriconazol	0,062-0,125	0,062	0,125	0,125-0,5
	Anfotericina B	0,125-0,5	0,25	0,5	0,125-0,5
	<i>P.pseudo-caryophyllus</i>	64-128	64	128	128≥512

#### ***4.5 Ação de voriconazol, anfotericina B e extrato bruto da folha de P. pseudocaryophyllus na espessura da cápsula e parede celular de C. neoformans melanizados e não melanizados.***

As medidas realizadas pelas medianas da espessura da cápsula e da parede celular para seis (6) isolados de *C. neoformans* melanizados e seis não melanizados sofreram alterações com a presença dos antifúngicos e do extrato bruto da planta. Estes componentes da célula mostraram-se com redução da sua espessura quando na presença de voriconazol, de anfotericina B e do extrato bruto de *P. pseudocaryophyllus* quando comparados com o controle (ausência dos fármacos ou do extrato da planta) independente dos isolados serem ou não melanizados.

Os valores de mediana das medidas da cápsula e da parede de células de *C. neoformans* melanizados e não melanizados submetidas à ação de voriconazol encontram-se nas Figuras 21 e 22.

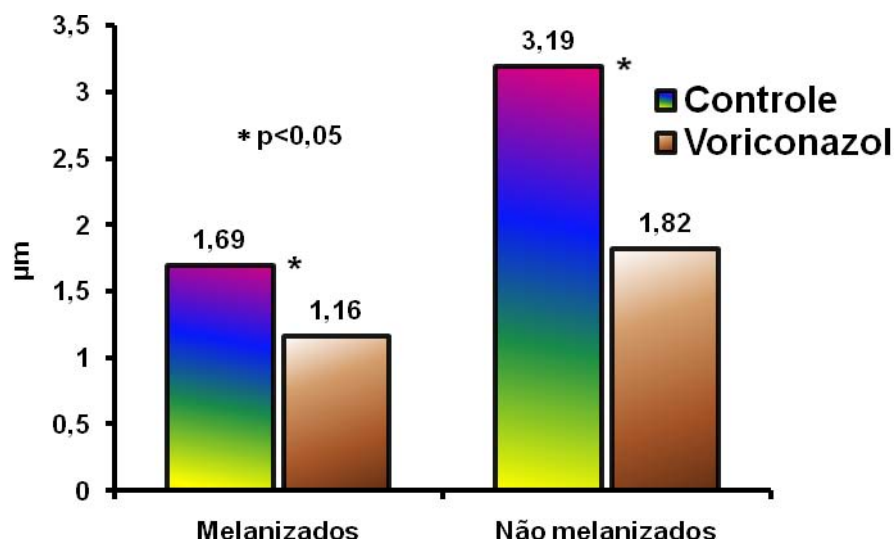


Figura 21. Mediana da espessura da cápsula de isolados de *C. neoformans* melanizados e não melanizados na presença de voriconazol (n=180).

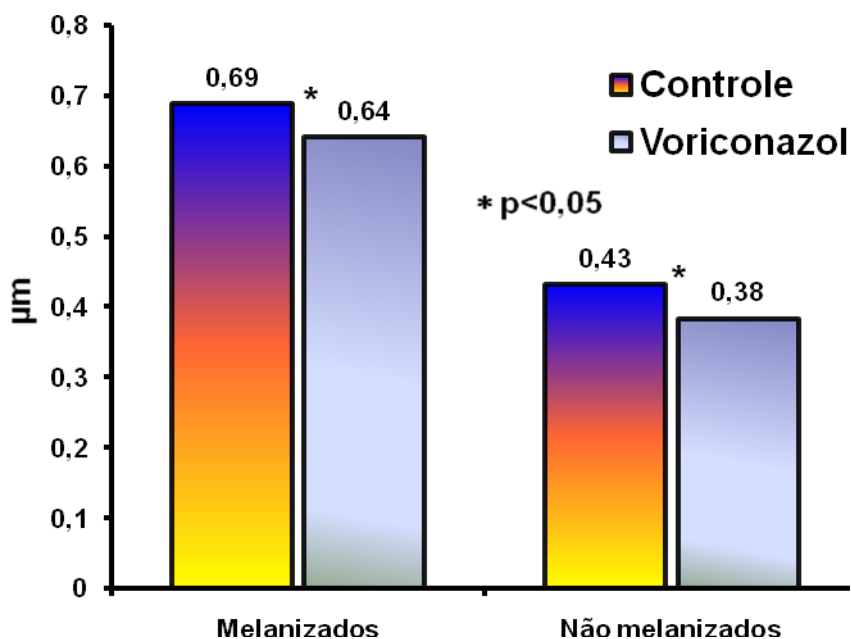


Figura 22. Mediana da espessura da parede de isolados de *C. neoformans* melanizados e não melanizados na presença de voriconazol (n=180).

Quando se realizou a média dos valores da espessura da cápsula e da parede de *C. neoformans* submetidos à ação de voriconazol, considerando-se como controle *C. neoformans* não melanizados, verificou-se uma redução de 13,5%, na espessura da cápsula e de 11,3% na espessura da parede devido à ação de voriconazol. Estes dados encontram-se na Figura 23.

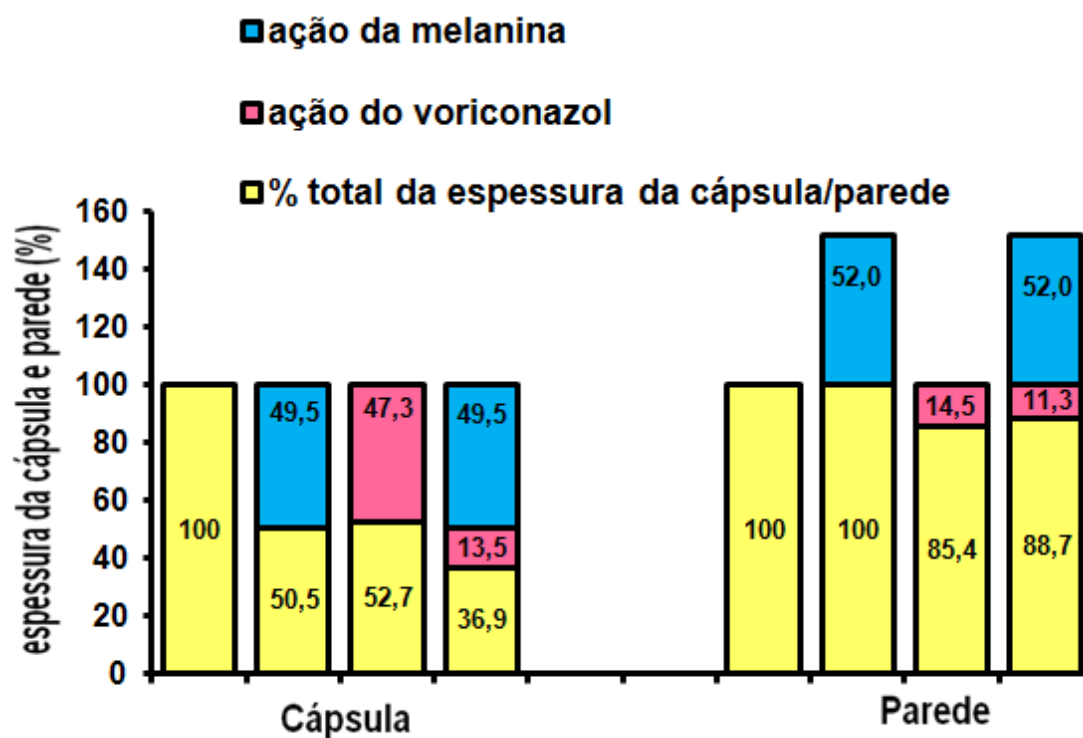


Figura 23. Espessura da cápsula e parede de *C. neoformans* melanizados e não melanizados sob a ação de voriconazol.

A mediana da espessura da cápsula e da parede celular de células de *C. neoformans* melanizados e não melanizados submetidas à ação de anfotericina B encontram-se nas Figuras 24 e 25.

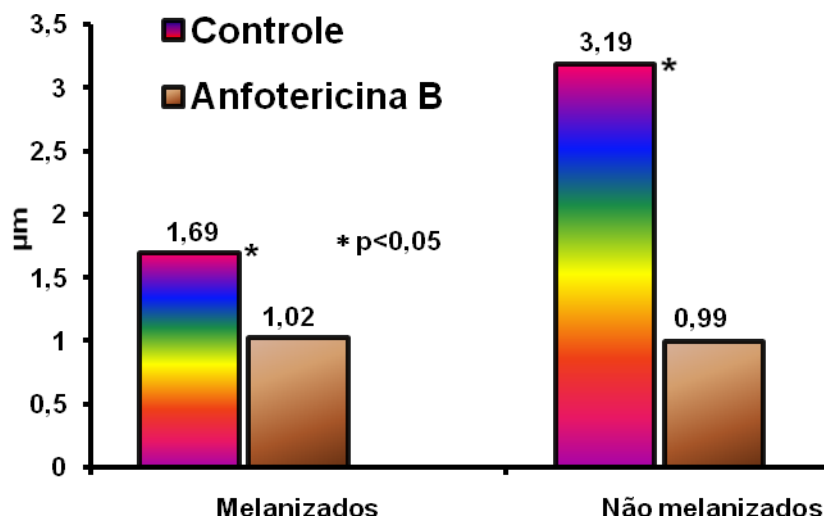


Figura 24. Mediana da espessura da cápsula de *C. neoformans* na presença de anfotericina B (n=180).

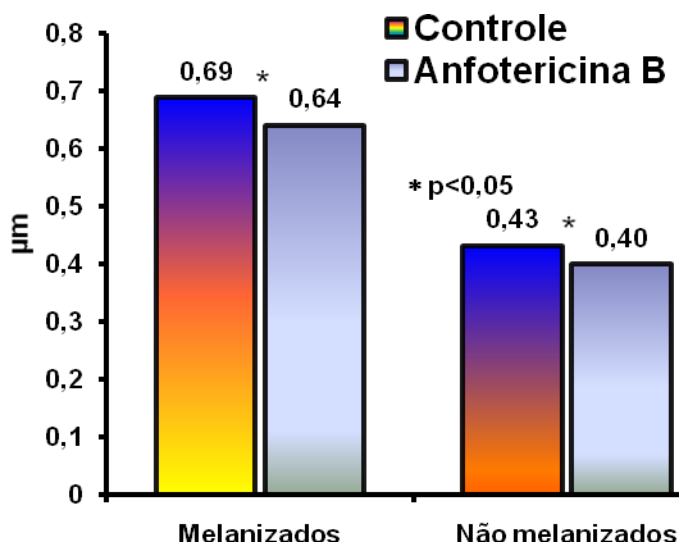


Figura 25. Mediana da espessura da parede de isolados de *C. neoformans* melanizados e não melanizados na presença de anfotericina B (n=180)

Quando se realizou a média dos valores da espessura da cápsula e da parede de *C. neoformans* submetidos à ação de anfotericina B, considerando-se como controle *C. neoformans* não melanizados, verificou-se uma redução de 1,9%, no tamanho da cápsula e de 3,3% na espessura da parede devido a ação de anfotericina B. Estes dados mostram encontram-se na Figura 26.

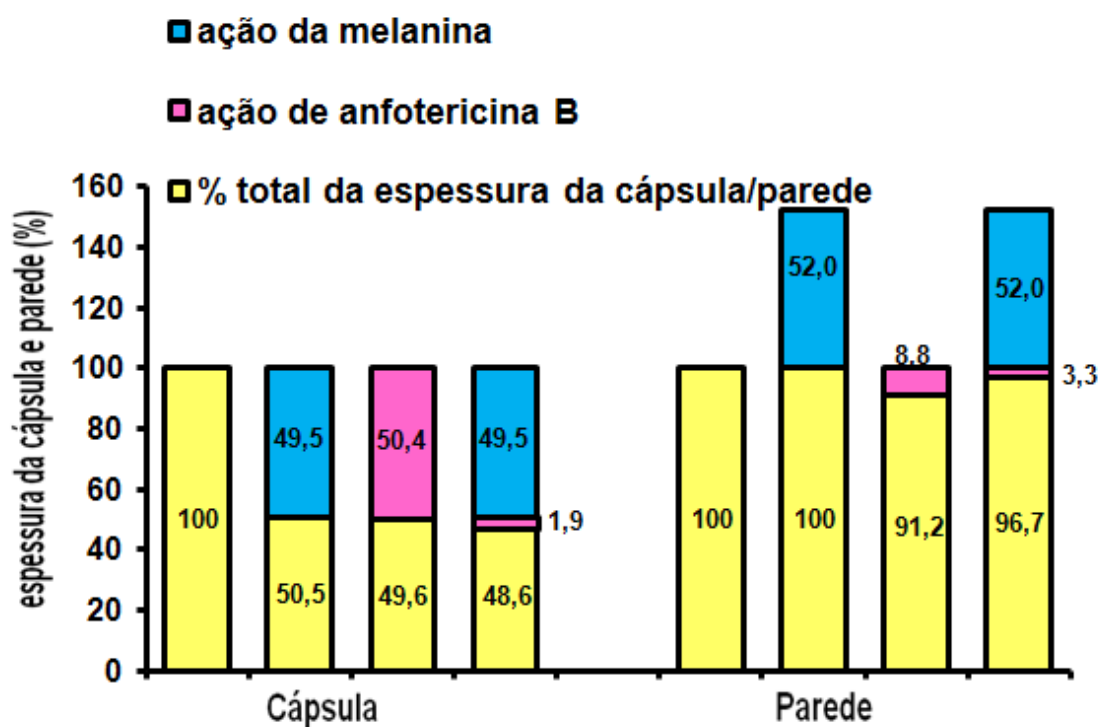


Figura 26. Espessura da cápsula e parede de *C. neoformans* melanizados e não melanizados sob a ação de anfetocina B.

Os valores de mediana da espessura da cápsula e da parede de células de *C. neoformans* melanizados e não melanizados submetidas à ação do extrato bruto da planta *P. pseudocaryophyllus* encontram-se nas Figuras 27 e 28.

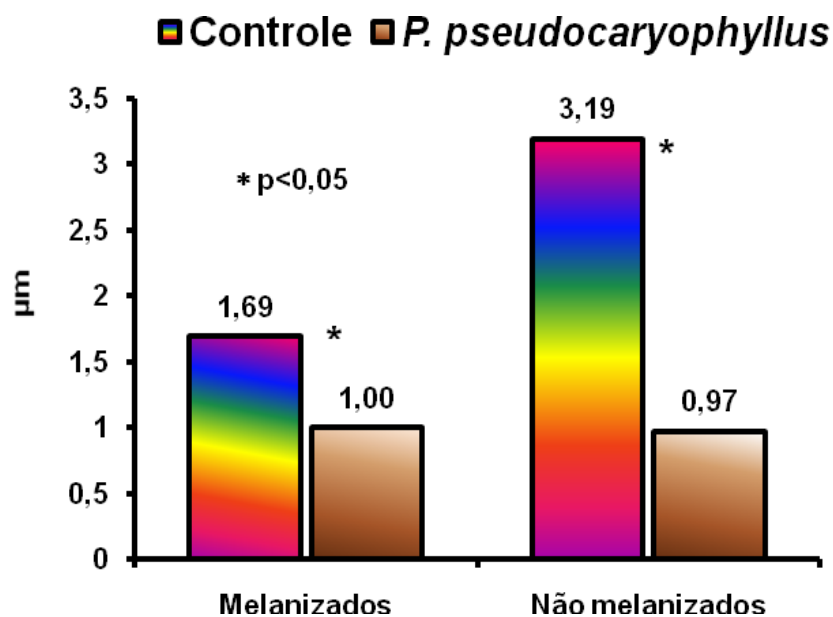


Figura 27. Mediana da espessura da cápsula de isolados de *C. neoformans* melanizados e não melanizados na presença de *P. pseudocaryophyllus* (n=180).

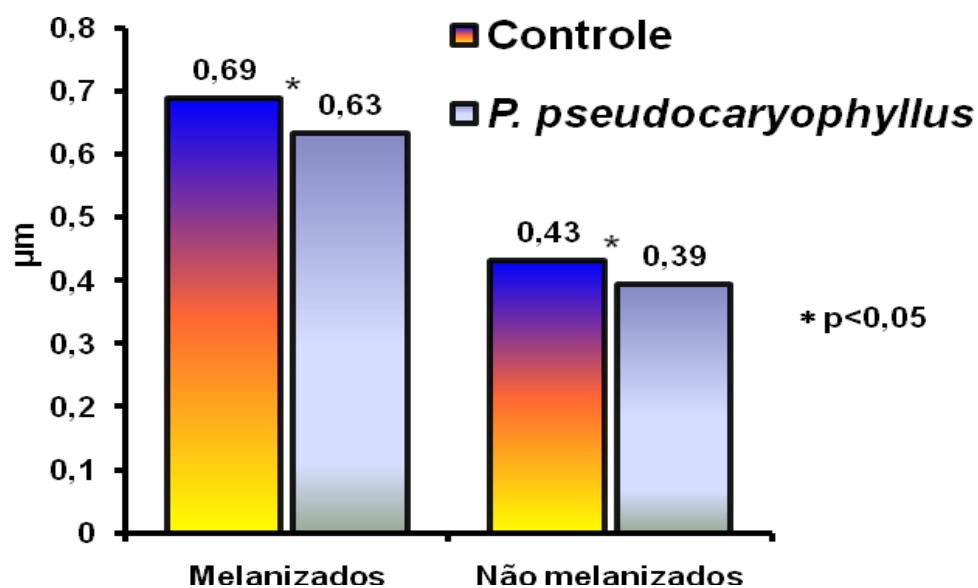


Figura 28. Mediana da espessura da parede de isolados de *C. neoformans* melanizados e não melanizados na presença de *P. pseudocaryophyllus* (n=180).

Quando se realizou a média dos valores espessura da cápsula e da parede de *C. neoformans* submetidos a ação do extrato da planta de *P. pseudocaryophyllus*, considerando-se como controle *C. neoformans* não melanizados, verificou-se uma redução de 13 %, no tamanho da cápsula e de 12,5% na espessura da parede devido a ação da planta. Estes dados encontram-se na Figura 29.

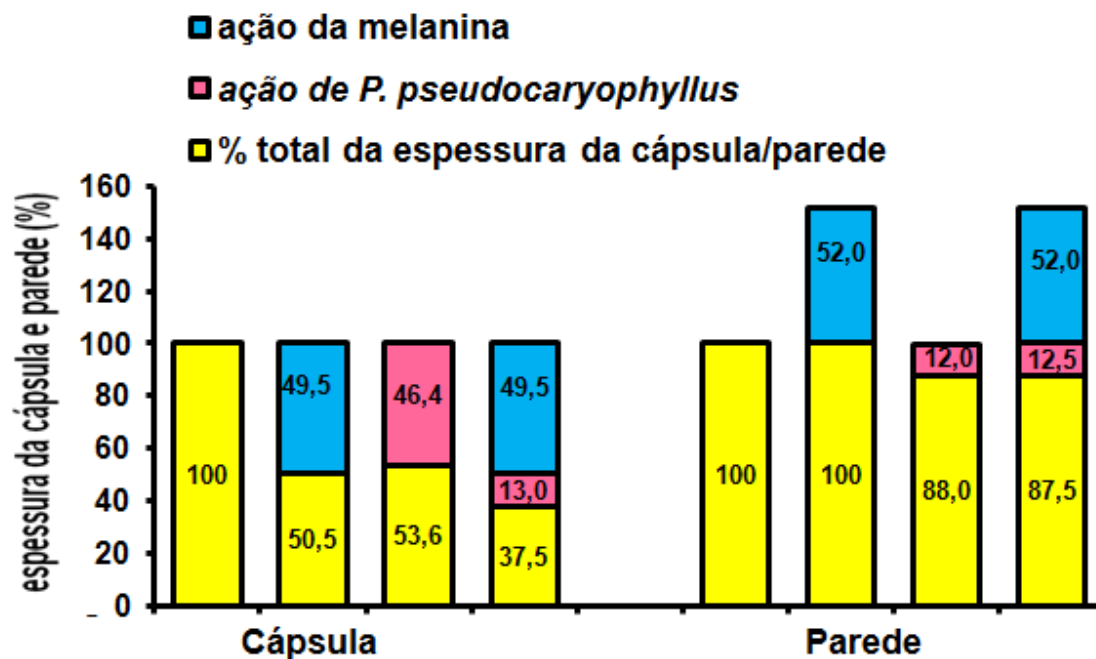


Figura 29. Espessura da cápsula e parede de *C. neoformans* melanizados e não melanizados sob a ação de extrato da folha de *P. pseudocaryophyllus*.

A figura 30 mostra a espessura da cápsula e parede dos isolados melanizados (DOPA+) e não melanizados (DOPA-) submetidos ao tratamento de voriconazol, anfotericina B, e extrato bruto da planta *P. pseudocaryophyllus*, e isento de tratamento.

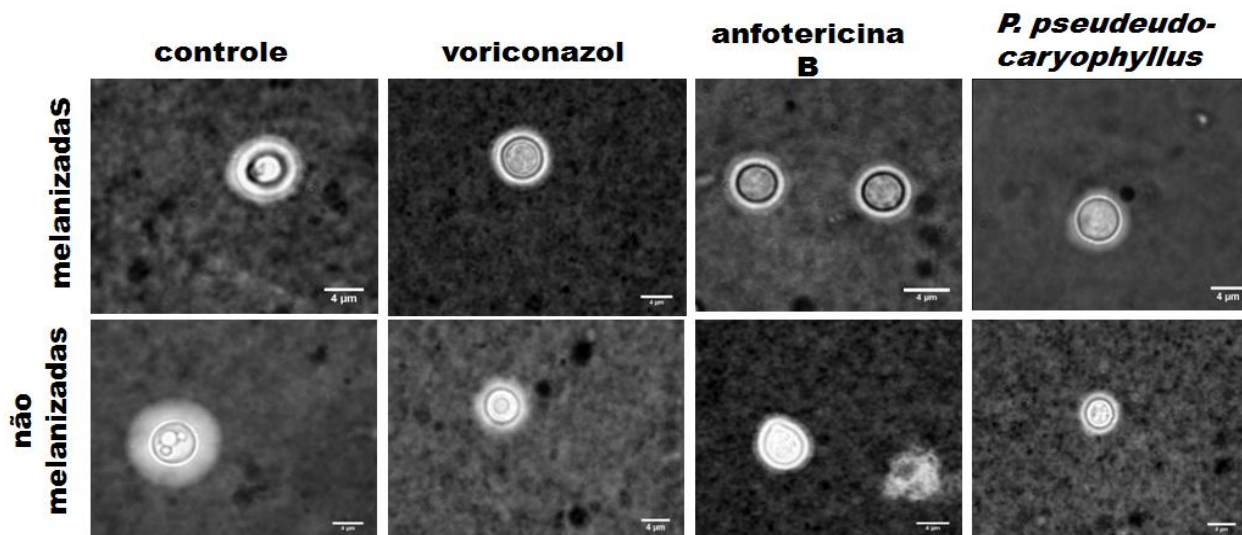


Figura 30. Fotomicroscopia da espessura da cápsula e da parede de isolados de *C. neoformans* melanizados e não melanizados. Controle (sem fármaco e extrato da planta), e sob a ação dos antifúngicos voriconazol; anfotericina B e extrato bruto da folha de *P. pseudocaryophyllus*. Visualização com tinta da China. (Escala 4µm).

## 5 DISCUSSÃO

A coloração escura observada por todos os isolados de *C. neoformans* em meio contendo L-DOPA, verificado neste trabalho mostrou que estes microrganismos foram capazes através da atividade de fenol-oxidase de produzir a melanina. A produção de melanina por muitas espécies fúngicas, incluindo *C. neoformans* constitui um papel de grande importância na virulência destes microrganismos (Nosanchuk & Casadevall 2003). A camada de melanina é capaz de proteger o microrganismo contra ações ambientais desfavoráveis a ele e favorece o desenvolvimento do fungo, pois auxilia no transporte de sais e de outros constituintes através da célula (Mandal et al. 2007). Isolados de *C. neoformans* que não apresentam atividade fenol-oxidase são em maioria das vezes não virulentos para camundongos, como verificado em trabalhos experimentais (Kwon-Chung et al. 1992; Ngamskulrungrroj & Meyer 2009). O neurotropismo de *C. neoformans* provavelmente está associado com a capacidade do fungo de converter catecolaminas em melanina (Garcia-Rivera et al. 2005). Maior resistência a determinados antifúngicos como anfotericina B e caspofungina pode ser atribuída à presença deste composto na parede celular de *C. neoformans* (Casadevall et al. 2000; Ikeda et al. 2003).

Medida da espessura da parede com uma mediana de 0,98  $\mu\text{m}$  como observada nos isolados de *C. neoformans* melanizados e de 0,42  $\mu\text{m}$  para os isolados não melanizados verificado neste estudo mostraram que a camada de melanina formada no meio de L-DOPA foi capaz de influenciar o tamanho deste componente celular. Resultados semelhantes foram encontrados por Mandal et al. (2007) ao verificarem através de microscopia eletrônica, que a espessura da parede de células de *C. neoformans* melanizadas mostrava-se aproximadamente duas vezes maior do que as de células não submetidas à melanização. Estes resultados podem ser explicados, pois já que a melanina se deposita na parede da célula, é óbvio que a espessura desta estrutura seja diretamente proporcional à quantidade de melanina.

A formação da cápsula, estrutura essencial para a virulência de *C. neoformans* e que lhe atribui uma aparência distinta, aumenta de tamanho no hospedeiro durante o processo de infecção, mostrando a associação desta estrutura com a patogenicidade deste microrganismo (Steenbergen et al. 2003; Doering 2009). As células melanizadas de *C. neoformans* neste trabalho mostraram uma mediana da espessura da cápsula de 1,52  $\mu\text{m}$  de diâmetro enquanto as não melanizadas apresentaram a cápsula com

espessura bastante superior com uma mediana de 3,54  $\mu\text{m}$ . Similarmente aos resultados encontrados neste estudo, Kwon-Chung et al. (1982), observaram que cepas com deficiência de pigmento formavam cápsulas maiores. A intensidade da melanina que se estabelece na parede celular do fungo, é menor nos isolados altamente capsulados devido ao efeito protetor do material capsular.

A secreção de exoenzimas como a fosfolipase, considerada de grande valor relacionado à virulência dos microrganismos, pois facilita a sua penetração no organismo hospedeiro foi observada para todos os isolados de *C. neoformans* estudados em nosso trabalho. Vidotto et al. (1997), foram os primeiros pesquisadores a verificarem a produção da fosfolipase por *C. neoformans* quando, 22 dos 23 agentes de criptococose produziram esta enzima com atividade enzimática (Pz) variando entre 0,27 e 0,49. A correlação entre atividade enzimática e outros fatores de virulência tem sido estudada por diferentes pesquisadores, sendo que Vidotto et al. 1997 mostraram que havia uma forte correlação de produção da fosfolipase e o tamanho da cápsula de isolados de *C. neoformans*. Neste trabalho verificou-se uma correlação positiva entre isolados melanizados e uma alta produção de fosfolipase. A atividade enzimática fortemente positiva (Pz) < 0,64 ocorreu em 85,3%, dos isolados melanizados e 79,5% em não melanizados.

Determinados fatores de virulência podem interferir na eficácia dos medicamentos usados na terapia das infecções fúngicas, sendo que a melanização parece afetar significativamente a atividade de antifúngicos importantes, disponíveis no mercado como anfotericina B e caspofungina (van Duin et al. 2002; Ikeda et al. 2003). Segundo van Duin et al. (2002), *H. capsulatum* e *C. neoformans* quando melanizados são significativamente protegidos dos efeitos fungicida de anfotericina B e caspofungina.

Embora os resultados apresentados tenham mostrado similaridade com relação à CIM de anfotericina B, voriconazol e do extrato da planta *P. pseudocaryophyllus* encontrada para fungos melanizados e não melanizados isso não ocorreu quando se verificou a CFM de anfotericina B para estes isolados. A CFM deste antifúngico para isolados melanizados foi até de oito vezes maior do que para isolados não melanizados. Semelhante aos resultados deste trabalho, Ikeda et al. (2003), observaram que a CIM de anfotericina B e fluconazol, não foram alterados pela melanização, porém, células viáveis foram encontradas somente entre células melanizadas de *C. neoformans*. van Duin et al. (2002), demonstraram que não houve diferenças de CIM de anfotericina B e

caspofungina entre células de *C. neoformans* e de *H. capsulatum* melanizados ou não, mas estes antifúngicos mostravam maior atividade fungicida entre os isolados não melanizados.

A redução de atividade de anfotericina B em células melanizadas pode inferir que a melanina seja capaz de atenuar a eficácia deste fármaco contra *C. neoformans*. O mecanismo pelo qual anfotericina B atua, não é totalmente conhecido, mas pode ser sugerido que este fármaco se liga a melanina presente na parede celular do fungo reduzindo a sua concentração (Eisenman et al. 2005). *Cryptococcus neoformans* melanizados são frequentemente encontrados no tecido do hospedeiro (Nosanchuk et al. 2000), o que pode explicar em parte a ineficácia de tratamento com anfotericina B em determinadas situações. Estes resultados sugerem que embora a melanina tenha sido capaz de proteger o fungo de morte celular (CIM), este componente não foi capaz de inibir o crescimento do fungo sob a ação de anfotericina B (CFM).

Por outro lado, voriconazol, antifúngico capaz de penetrar no tecido cerebral do hospedeiro não mostrou redução de atividade (CFM igual em células melanizadas e não melanizadas) para destruição das células melanizadas, sugerindo que este antifúngico possa ser mais eficaz no tratamento da criptococose.

A atividade *in vitro* observada neste trabalho para o extrato bruto da folha de *P. pseudocaryophyllus* sobre *C. neoformans*, onde foi verificada inibição de crescimento em concentrações de 64 µg/mL para alguns isolados, comprova que a planta apresentou atividade antifúngica. As propriedades antifúngicas de *P. pseudocaryophyllus* também têm sido descritas contra outros microrganismos. O óleo essencial desta planta inibiu o crescimento de *C. albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* em concentração inibitória mínima variando de 0,047 a 1,5 µg/mL (Lima et al. 2006). Atividade antimicrobiana de outras plantas de uso na medicina popular tem sido observada para *C. neoformans*. Passos et al. 2002 mostraram que a cera epicuticular retirada da folha de *Caryocar brasiliensis* inibiu o crescimento de 91,3% (21/23) dos isolados de *C. neoformans* em concentração ≤ a 250 µg/mL. O óleo da folha de *Eugenia dysenterica* mostrou atividade inibitória sobre este fungo, em uma concentração <250µg/mL (Costa et al. 2000).

A atividade antifúngica de *P. pseudocaryophyllus* ocorre provavelmente devido à presença de eugenol, o seu principal constituinte. Em experimentos *in vitro* plantas ricas em eugenol apresentaram baixos valores de CIM para dermatófitos e para leveduras como *C. albicans* e *C. neoformans* (Lemos et al. 2005; Silva et al. 2001, Lima

et al. 2006). Interessante, o fato de que a melanização da célula fúngica não mostrou interferência nos resultados, encontrados neste estudo, de CIM ou de CFM para isolados de *C. neoformans*, desta forma, sugere-se que *P. pseudocaryophyllus* com relação à formação de melanina tem a sua atividade semelhante ao de voriconazol.

A síntese de melanina é de grande importância para a patogenicidade de um fungo e representa por isto um alvo em potencial para a atuação dos antifúngicos. O tamanho da parede e da cápsula de isolados melanizados e não melanizados mostraram valores que foram estatisticamente diferentes nestes dois tipos de células, demonstrando que os antifúngicos e o extrato da planta foram capazes de reduzir a espessura destas duas estruturas independente da presença da melanina, mas que a atuação foi maior nos isolados não melanizados. Como pode ser verificado pelos resultados obtidos, voriconazol, em células não melanizadas reduziu o tamanho da parede em 14,5%. Em células melanizadas, embora tenha sido verificado aumento da espessura em 52% devido à melanização, observou-se que voriconazol foi capaz de redução da espessura da parede em 11,3%. A melanina presente na parede não consegue absorver os derivados azólicos e não representa, portanto, um efeito protetor contra o antifúngico (van-Duin et al. 2004). A atuação na redução da espessura da cápsula (13,5%) por voriconazol como detectado neste estudo pode ocorrer por alteração dos lipídios presentes no microrganismo (Ghannoun et al. 1994). Voriconazol atua sobre a síntese de ergosterol e é possível que a inibição da síntese deste lipídio faça com que haja déficit de membrana que interfere com o tráfego de vesículas necessárias para a síntese da cápsula. A síntese da cápsula pode ocorrer intracelularmente, sendo que os polímeros de GXM, seus principais constituintes, são armazenados nas vesículas de Golgi, passando pela membrana e parede celular para a formação desta estrutura onde são liberados (Doering, 2009). van-Duin et al. 2004 verificaram resultados semelhantes na avaliação de espessura da cápsula de *C. neoformans* sob a ação de voriconazol.

Embora neste trabalho tenha sido observado que a suscetibilidade em destruir a célula fúngica melanizada por anfotericina B tenha sido diminuída pela ação da melanina, a atuação de anfotericina B na parede foi baixa tanto nas células melanizadas (3,3%) quanto nas não melanizadas (8,8%). Trabalhos realizados com anfotericina B e fluconazol mostram que estas substâncias se ligam a melanina, diminuindo a sua concentração (van-Duin et al 2002; Ikeda et al, 2003). Ainda que a melanina tivesse sido responsável pela redução da cápsula em 49,5%, quando analisou-se a atividade da anfotericina B em células não melanizadas verificou-se uma redução de 50,4% no

tamanho da cápsula dessas células, e uma redução de 1,9% devida somente à ação do antifúngico em células melanizadas. Trabalhos experimentais realizados por Zaragoza et al. 2005, em murinos mostraram que células de *C. neoformans* sofreram alterações morfológicas sob a ação de anfotericina B, observadas pela redução da espessura da cápsula. Estes resultados permitem sugerir que além da ação sobre a formação de poro na membrana permitindo o extravasamento de ion, a anfotericina B pode atuar no desenvolvimento da cápsula de *C. neoformans*.

Interessantemente, os resultados encontrados neste trabalho usando a planta *P. pseudocaryophyllus* mostraram, assim como aos dos antifúngicos, alterações morfológicas, verificadas pela redução na espessura da cápsula e da parede de *C. neoformans*. Como pode ser verificado pelos resultados obtidos, em células não melanizadas o extrato da planta foi capaz de reduzir a espessura da parede em 12%, e em células melanizadas este percentual foi muito semelhante, ou seja, de 12,5%. A redução de 71,2% na espessura da cápsula nos isolados não melanizados e de 20,6% nos melanizados foi maior, do que a observada para isolados sob as mesmas condições, submetidos à ação de voriconazol e de anfotericina B, pressupondo que o mecanismo de ação desta planta para inibição de crescimento do fungo esteja provavelmente relacionado com a formação da cápsula. Estudos posteriores deverão ser realizados para que se possa concluir com maior precisão os resultados obtidos com relação a atividade desta planta sobre *C. neoformans*.

## 6 CONCLUSÕES

1-Todos os isolados de *C. neoformans* foram capazes de utilizar a fenoloxidase (lacase) para a produção de melanina na presença de L-DOPA, sugerindo que este fenômeno pode ocorrer *in vivo* quando o fungo encontra condições adequadas.

2- Em isolados de *C. neoformans* melanizados a espessura da parede foi maior do que nos não melanizados. Como já se conhece, a parede é responsável pela deposição de melanina, o que ocorre para os fungos dematiáceos, que se tornam de coloração escura.

3-A intensidade de melanina estabelecida na parede celular do fungo foi menor nos isolados de tamanho capsular mais extenso, proporcionado possivelmente pelo efeito protetor atribuído à cápsula.

4-Embora a atividade enzimática constitua provavelmente um fator de virulência relacionada aos fungos, a produção de fosfolipase pelos isolados de *C. neoformans* não se apresentou correlacionada com a presença ou não de melanina, a qual também é considerada como tributo de resistência do fungo.

5-A presença de melanina não mostrou interferência quanto ao comportamento de resposta de suscetibilidade *in vitro* (CIM) de antifúngicos como voriconazol, anfotericina B ou da planta *P. pseudocaryophyllus* nos isolados de *C. neoformans*. Entretanto, a análise de CFM mostrou que isolados melanizados necessitavam de maior quantidade de anfotericina B para destruição deste microrganismo, sugerindo que a melanina depositada na parede celular pode atuar como fator de resistência ao antifúngico.

6- Há fortes indicações de que os antifúngicos e o extrato da planta foram capazes de atuar sobre a parede e a cápsula de *C. neoformans*. Estas estruturas mostraram uma redução de suas espessuras sob a ação do voriconazol, anfotericina B e extrato bruto da folha de *P. pseudocaryophyllus*, sugerindo que a inibição do crescimento de *C. neoformans* esteja provavelmente relacionada com a cápsula e parede desta levedura.

7- A redução da espessura da cápsula de *C. neoformans* foi maior quando sob a ação de anfotericina B e do extrato bruto da planta do que quando sob a ação de voriconazol, entretanto com relação à redução da espessura da parede de *C. neoformans* sob a ação de antifúngicos e do extrato da planta verificou-se que a atividade de voriconazol e do extrato bruto da folha de *P. pseudocaryophyllus* foi maior do que de anfotericina B, sugerindo que este fármaco esteja mais relacionado à cápsula, enquanto voriconazol mais à parede celular.

## 7 REFERÊNCIAS

- Abadi J, Nachman S, Kressel AB, Pirofski L 1999. Cryptococcosis in children with AIDS. *Clin Infect Dis* 28: 309-13.
- Abegg MA, Cella FL, Faganello J, Valente P, Schrank A, Vainstein MH 2006. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* Isolated from the excreta of Psittaciformes In a Southern Brazilian Zoological Garden. *Mycopathologia* 161:83-91.
- Adebajo AC, Oloke KJ, Aladesanmi AJ 1989. Antimicrobial activities and microbial transformation of volatile oils of *Eugenia uniflora*. *Fitoterapia* 60: 451-455.
- Almeida SPA, Proença CEB, Sano SM, Ribeiro JF 1998. Cerrado: Espécies vegetais úteis. Planaltina. *Embrapa - CPAC* 464p.
- Almtorp GT, Hazell AC, Torssel KBG 1991. A lignan and pyrone, and other constituents from *Hyptis capitata*. *Phytochemistry* 30: 2753-2756.
- Alspaugh JA, Cavallo LM, Perfect JR, Heitman J. 2000. RAS1 regulates filamentation, mating and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans* *Mol Microbiol* 36: 352-365.
- Alves TMA, Silva AF, Brandão M, Grandi TSM, Smânia EF, Smânia Jr A, Zani CL 2000. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 367-373.
- Ampel NM 2006. Emerging Disease Issues and Fungal Pathogens Associated with HIV Infection *Emerging Infectious Diseases* 2: 109-116.
- Asekun OT, Ekundayo O, Adeniyi BA 1999. Antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis suaveolens* leaves. *Fitoterapia* 70: 440-44.2
- Baltazar LM, Ribeiro MA 2008. Primeiro isolamento ambiental de *Cryptococcus gattii* no Estado do Espírito Santo First isolation of *Cryptococcus gattii* from the environment in the State of Espírito Santo. *Rev Soc Bras de Med Trop* 41:449-453.
- Bicanic T, Harrison TS 2004. Cryptococcal meningitis. *British Medical Bulletin* 72: 99-118.
- Bivanco FC, Machado Cd'A S., Martins EL 2006. Cutaneous cryptococcosis. *Arq Med ABC*. 31: 102-109.

Blaschke-Hellmessen R 2000. Cryptococcus species etiological agents of zoonoses or sapronosis? *Mycoses* 43: 48-60

Boekhout T, Theelan B, Dias M, Fell JW, Hop WC, Abeln EC F, Dromer F, Meyer W 2001. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 147:891-907.

Bose I, Reese AJ, Ory JJ, Janbon G, Doering TL 2003. A Yeast under Cover: the Capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* 2: 655–663.

Bovers M, Hagen F, Boekhout T 2008. Diversity of the *Cryptococcus neoformans*: *Cryptococcus gattii* species complex. *Rev Iberoam Micol* 25: S4-S12.

Brouwer AE, Rajanuwong A, Chierakul W, Griffin GE, Larsen RA, White NJ, Harrison TS 2004. Combination antifungal therapies for HIV-associated cryptococcal meningitis: a Randomized trial. *Lancet* 363: 1764-1767.

Buchanan KL Murphy, JW 1998. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? *Emerg Infect Dis* 4: 71-83.

Cardoso HT, Santos ML 1948. Estudos sobre a presença de antibióticos nos vegetais. *Rev Bras Med São Paulo* 62: 67-70.

Casadevall A, Perfect JR 1998. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. In: Casadevall A & Perfect JR, ed. *Cryptococcus neoformans*, Washington, ASM Press, 41-71p.

Casadevall A, Perfect JR 1998. Virulence Factors. In: Casadevall A & Perfect JR, ed. *Cryptococcus neoformans*, Washington, ASM Press, 145-176p.

Casadevall A, Rosas AL, Nosanchuk JD 2000. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr.Opin.Microbiol* 3: 354-358.

Casadevall A, Steenbergen JN, Nosanchuk J 2003. 'Ready made' virulence and dual use virulence factors in pathogenic environmental fungi the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Curr Opin Microbiol* 6:332-337.

Casadevall A, Pirofski LA 2007. Accidental Virulence, Cryptic Pathogenesis, Martians, Lost Hosts, and the Pathogenicity of Environmental Microbes. *Eukaryotic Cell* 6: 2169–2174.

Castañón-Olivares LR, Arreguín-Espinosa R, Ruiz-Palacios G, López-Martínez R 2000. Frequency of *Cryptococcus* species and varieties in México and their compassion with some Latin American Countries. *Rev Latinoameric Microbiol* 42: 35-40.

Chang YC, Kwon-Chung KJ 1994. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence *Mol Cell Biol* 14: 4912-4919.

Chang YC, Kwon-Chung KJ 1998. Isolation of the third capsule-Associated gene, *CAP60*, required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infection Immunity* 66:52230-2236.

Chang YC, Wickes BL, Miller GF, Penoyer LA, Kwon-Chung KJ 2000. *Cryptococcus neoformans* *STE12* regulates virulence but is not essential for mating. *The J Exper Medicine* 191:871-878.

Chaskes S, Tyndall RL 1975. Pigment production by *Cryptococcus neoformans* from para-and ortho-diphenols: effect of the nitrogen source. *J Clin Microbiol* 1:509-514.

Chen S, Sorrel T, Nimmo G, Speed B, Currie B, Ellis D, Marriott D, Pfeiffer T, Parr D, Byth K, and the Australasian Cryptococcal Study Group 2000. Epidemiology and host and variety dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group. *Clin infect Dis* 31: 499-508.

Cherniak R, Sundstrom JB 1994. Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 62: 1507-1512.

Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America *Clinical Infectious Diseases* 50: 291–322.

CLSI *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of yeasts; Third Informational Supplement*. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2002.

CLSI *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of yeasts; Third Informational Supplement*. CLSI document M27-S3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

Coenjaerts FEJ 2006. CONFERENCE REPORT The Sixth International Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis. *FEMS Yeast Res* 6: 312–31.

Colom MF, Frases S, Ferrer, Jover A, Andreu M, Reus S, Sanchez M, Torres-Rodríguez JM 2005. First case of Human cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Spain. *J Clin Microbiol* 43: 3548-50.

- Corrêa MPSC, Oliveira EC, Duarte RRBS Pardal PPO, Oliveira FM, Severo LC 1999. Criptococose em crianças no estado do Pará, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 32: 505-508.
- Costa SPSE, Lazéra MS, Santos WRA, Morales BP, Bezerra CCF, Nishikawa MM, Barbosa GG, Trilles Luciana, Nascimento JLM, Wanke B 2009. First isolation of *Cryptococcus gattii* molecular type VGII and *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI from environmental sources in the city of Belém, Pará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 104: 662-664.
- Costa TR, Fernandes OFL, Santos SC, Oliveira CMA, Lião IM, Ferri PH, Paula JR, Ferreira HD, Sales BHN, Silva MRR 2000. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. *J Ethnopharmacol* 72: 111-117.
- Cox GM, Mcdade HC, Chen SC, Tucker SC, Gottfredsson M, Wright LC, Sorrell TC, Leidich SD, Casadevall A, Ghannoum JR, Perfect JR 2001. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 39: 166-175.
- Craveiro AA, Fernandes AG, Andrade CHS, Matios FJA, Alencar JW, Machado MIL 1981. Óleos essenciais de plantas do nordeste. Fortaleza: Edição UFC; 150 p.
- Cruz M Cristina, Fox DS, Heitman J 2001. Calcineurin is required for hyph during mating and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*. *The EMBO Journal* 20: 1020-1032.
- Cunha AP 2005. *Farmacognosia e Fitoquímica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Darzé C, Lucena R, Gomes I, Melo A 2000. Características clínicas laboratoriais de 104 casos de meningoencefalite criptocócica. *Rev Soc Bras Med Trop* 33: 21-26.
- Delgado ACN, Taguchi H, Mikami Y, Myiajy M, Villares MCB, Moretti ML 2005. Human cryptococcosis: relationship of environmental and clinical strains of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from urban and rural areas. *Mycopathologia* 159: 7-11.
- Deresinski SC, Stevens DA 2003. Caspofungin. *Clin Infect Dis* 36: 1445-1457.
- Dias ALT, Brigagão MRPL, Colepicolo P, Siqueira AM, Silva EG, Paula CR. 2006. Superoxide dismutase in *Cryptococcus neoformans* varieties *gattii*, *grubii* and *neoformans*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 107-109.

Dismukes WE Introduction to Antifungal Drugs 2000 *Clinical Infectious Diseases* 30: 653–657.

Djordjevic JT, Del Poeta M, Sorrell TC, Turner KM, Wright LC 2005. Secretion of cryptococcal phospholipase B1 (PLB1) is regulated by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor *Biochem J* 389: 803-812.

Doering TL 2009. How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharidecapsule formation in *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Microbiol* 63: 223–47.

Domingues Souza C, Felfili JM 2006. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. *Acta Bot Bras* 20: 135-142.

Dromer F, Mathoulin-Péllissier S, Fontanet A, Ronin O, Dupont B, Lortholary O 2004. Epidemiology of HIV associated cryptococcosis in France (1985-2001): comparison of the pre- and post HAART era. *AIDS* 18: 555-562.

D'Souza C, Heitman J 2001. Dismantling the *Cryptococcus* coat. *Trends Microbiol* 9: 112-113.

Duarte MCT 2006. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. *Multi Ciência: Construindo a história dos Produtos Naturais* 7: 1-16.

Eisenman HC, Nosanchuk JD, Webber JBW, Emerson RJ, Camesano TA, Casadevall A 2005. Microstructure of cell wall-associated melanin in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Biochemistry* 44: 3683-3693.

Espinel-Ingroff A 2008. Mechanisms of resistance to antifungal agents: Yeasts and filamentous fungi *Rev Iberoam Micol* 25: 101-106.

Ellerbroek PM, Walenkamp AM, Hoepelman AI, Coenjaerts FE 2004. Effects of the capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans* on phagocyte migration and inflammatory mediators. *Curr Med Chem* 11: 253-66.

Erickson T, Liu L, Gueyikian A, Zhu X, Gibbons J, Williamson PR 2001. Multiple virulence factors of *Cryptococcus neoformans* are dependent on VPH1. *Mol Microbiol* 42: 1121–1131.

Escandón P, Sánchez A, Martínez M, Meyer W, Castañeda E 2006. Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* species complex reveals as high genetic diversity and presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. *FEMS Yeast Res* 6: 625-635.

Farias V, Rocha LD, Preussler KH, Maranhão L T 2009 Organização estrutural da folha de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum, Myrtaceae. *Acta bot bras* 23: 398-406.

Favre B, Ryder NS 1996. Characterization of Squalene Epoxidase Activity from the Dermatophyte *Trichophyton rubrum* and its inhibition by terbinafine and other antimycotic agents. *Antimicrob Agents Chemo* 40: 443-447.

Fener R, Betti AH, Mentz S, Rates MK 2006. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Braz J Pharm Sci* 42: 369-394.

Fernandes OFL, Passos XS, Souza LKH, Miranda ATB, Cerqueira CHPV, Silva MRR. 2003. *In vitro* susceptibility characteristics of *Cryptococcus neoformans* varieties from AIDS patients in Goiânia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* Rio de Janeiro 98: 839-841.

Filiú WFOF, Wanke B, Agüena SM, Vilela VO, Macedo RCL, Lazera M 2002. Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revta Soc Bras Med Trop* 35: 591-595.

Fox DS, Cruz MC, Sai RAL, Ke H, Cox GM, Cardenas ME, Heitman J 2001. Calcineurin regulatory subunit is essential for virulence and mediates interactions with FKBP12±FK506 in *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol* 39: 835-849.

Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A 1999. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *J Clin Microbiol* 37: 838-840.

Frases S, Pontes B, Nimrichter L, Viana NB, Rodrigues ML, Casadevall A 2009. Capsule of *Cryptococcus neoformans* grows by enlargement of polysaccharide molecules. *PNAS* 106: 1228–1233.

Garcia-Rivera J; Eisenman H C; Nosanchuk J D; Aisen P; Zaragoza O; Moadel T; Dadachova E; Casadevall A 2005. Comparative analysis of *Cryptococcus neoformans* acid-resistant particles generated from pigmented cells grown in different laccase substrates. *Fungal Genet Biol* 42:989–998.

Gates MA, Thorkildson P, Kozel TR 2004. Molecular architecture of the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Mol Microbiol* 52: 13-24.

Ghannoum MA 2000 Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews* 13: 122-143.

Ghannoum MA, Spellberg BJ, Ibrahim AS, Ritchie JA, Currie B, Spitzer ED, Edwards JEJ, Casadevall A 1994. Sterol composition of *Cryptococcus neoformans* in the presence and absence of fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 2029–2033.

Giles SS, Batinic-Haberle I, Perfect JR, Cox GM 2005. *Cryptococcus neoformans* mitochondrial superoxide dismutase: an essential link between antioxidant function and high-temperature growth. *Eukaryot Cell* 4: 46-54.

Goldman D, Lee SC, Casadevall A 1994. Pathogenesis of Pulmonary *Cryptococcus neoformans* Infection in the Rat. *Infection and Immunity* 62: 4755-4761.

Gonzalez CE, Shetty, D, Lewis LL, Mueller BU, Pizzo PA, Walsh TJ 1996. Cryptococcosis in human immunodeficiency virus infected Children. *Pediatric Infectious Disease Journal* 15: 796-800.

González Á, Tobón ÁM 2006. Infecciones micóticas oportunistas en pacientes con VIH/SIDA Fungal opportunistic infections in HIV/AIDS patients. *Infectio* 10: 279-288.

Gressler E, Pizo MA, Morellato LPC 2006. Review paper: Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. *Revista Brasil Bot* 29: 509-530.

Groll AH, Kolve H 2004. Antifungal agents: *In vitro* susceptibility testing, pharmacodynamics, and prospects for combination therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 23: 256-270.

Halliday CL, Carter DA 2003. Clonal Reproduction and Limited Dispersal in an environmental population of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* isolates from Australia. *J Clin Microbiol* 41: 703-711.

Hamilton AJ, Gomez BL 2002. Melanins in fungal pathogens. *J Med Microbiol* 51: 189-191.

Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, Timothy J, Kirk PM, Lucking R, Lumbsch HT, Lutzoni F, Matheny PB, Powell MJ, Redhead S, Schoch CI, Mclaughlin DJ, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GI, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DI, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Ljalg UKO, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo, JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schußler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research* 111:509-547.

Hogan L, Klein B, Levitz S 1996. REVIEWS Virulence factors of medically important fungi clinical. *Microbiology* 9: 469-488.

Idnurm A, Bahn Y, Nielsen K, Lin X, Fraser JA 2005. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nature Reviews Microbiology* 3: 753-764.

Igreja RP, Lazera MS, Wanke B, Galhardo MCG, Kidd SE, Meyer W 2004. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro *Med Mycol* 42: 229-238.

Ikeda R, Shinoda T, Fukazawa Y, Kaufman L 1982. Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and Its application to serotyping of clinical isolates. *J Clin Microb* 16: 22-29.

Ikeda R, Nishikawa A, Shinoda T, Fukazawa Y 1985. Chemical characterization of capsular polysaccharide from *Cryptococcus neoformans* serotype A-D. *Microbiol Immunol* 29 981-991.

Ikeda R, Sugita T, Jacobson ES, Shinoda T 2003. Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. *Microbiol Immunol* 47: 271-277.

Janbon G 2004. Mini Review *Cryptococcus neoformans* capsule biosynthesis and regulation. *FEMS Yeast Research* 4: 765-777.

Jarvis JN; Bicanic T; Harrison TS 2007 Treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis in South Africa: the case for amphotericin B over conventional dose fluconazole for initial therapy. *Southern African Journal of HIV Medicine* 36-39pp.

Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A 2009. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochimica Polonica* 56: 211-224.

Kauffman CA 2006. Fungal Infections. *Proc AM Thorac Soc* 3: 35-40.

Kelly SL, Lamb DC, Taylor M, Corran AJ, Baldwin BC, Powderly WG 1994. Resistance to amphotericin B associated with defective sterol  $\Delta 8 \rightarrow 7$  isomerase in a *Cryptococcus neoformans* strain from an AIDS patient. *FEMS Microbiology Letters* 122: 39-42.

Khan S, Singhal S, Mathur T, Upadhyay DJ, Rattan A 2006. Antifungal susceptibility testing method for resource constrained laboratories *J Med Microb* 24: 171-176.

Khawcharoenporn T, Apisarnthanarak A, Mundy LM 2007. Non-*neoformans* cryptococcal infections: a systematic review. *Infection* 35: 51–58.

Kidd SE, Chow Y, Mak S, Bach PJ, Chen H, Hingston AO, Kronstad JW, Bartlett KH 2007. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen, *Cryptococcus gattii*, in British Columbia, Canada, and Pacific Northwest USA. *Appl Environ Microbiol* 73: 1433-1443.

Kingston DGI, Rao MM, Zucker WV 1979. Plant anticancer agents. IX. Constituents of *Hyptis tomentosa*. *J Nat Prod* 42: 496-499.

Klink CA, Machado RB 2005. A conservação do cerrado brasileiro. *Megadiversidade* 1: 147-155.

Klutts JS; Levery SB; Doering TL 2007. A  $\beta$ - 1,2-Xylosyltransferase from *Cryptococcus neoformans* Defines a New Family of Glycosyltransferases *J Biol Chem* 282: 17890–17899.

Kobayashi CCBA, Souza LKH, Fernandes OFL, Brito SCA, Silva AC, Sousa ED, Silva MRR 2005. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás state, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 47:203-207.

Kraus P R, Fox DS, Cox GM, Heitman J 2003. *Cryptococcus neoformans* MAP kinase Mpk1 regulates cell integrity in response to antifungal drugs and loss of calcineurin function. *Mol Microbiol* 48: 1377–1387

Kraus PR, Boily MJ, Steven SG Stajich JE, Allen A, Cox GM, Dietrich FS, Perfect JR, Heitman J 2004. Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated Genes with a genomic-DNA microarray. *Eukaryotic Cell* 3: 1535-9778

Kronstad JW 2007. Host-microbe interactions: The response of fungal and oomycete pathogens to the host environment. *Curr Opin Microbiol* 10: 303–306.

Kwon-Chung KJ 1976. A new species of *Fillobasidiella* the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. *Mycologia* 68:942-946.

Kwong-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE 1982. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* (serotype A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotype C and D). *J Clin Microbiol* 15: 535-537.

Kwon-Chung, KJ., Rhodes JC 1986. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun* 51: 218-223.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE Medical Mycology. Philadelphia: Lea and Figiber, 1992, 866p.

Kwon-Chung KJ, Edman JC, Wickes BL 1992. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 60: 602-605.

Kwon-Chung KJ, Wickes BL, Stockman L, Roberts GD, Ellis D, Howard DH 1992. Virulence, serotype, and molecular characteristics of environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Infect Immun* 60, 1869–1874.

Kwon-Chung KJ, Varma SA 2006. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res* 6:574-587

Kurtzman C.P, Fell J.W. The Yeast, A Taxonomic Study. Fourth edition, Elsevier, 1998

Kurtz MB, Douglas CM 1997. Lipopeptide inhibitors of fungal glucan synthase. *J Med Vet Mycol* 35: 79-86.

Lagrou K, Van Eldere J, Keuleers S, Hagen F, Merckx R, Verhaegen J, Peetermans WE, Boekhout T 2005. Zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a magpie to an immunocompetent patient. *J Intern Med* 257: 385-388.

Leal AL, Faganello J, Fuentefria AM, Boldo JT, Bassanesi MC, Vainstein MH 2008. Epidemiological profile of cryptococcal meningitis patients in Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia* 166:71-75.

Leimann BCQ, KoifmanII RJ 2009. Comunicação Breve: Sistemas de informação oficiais de meningite criptocócica, estado do Rio de Janeiro. *Rev Saúde Pública* 43:717-20.

Lemos JA, Passos XS, Fernandes OFL, Paula JR, Ferri PH, Souza LKH, Lemos AA, Silva MRR 2005. Antifungal activity from *Ocimum gratissimum* L. towards *Cryptococcus neoformans*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 55-58.

Lengeler KB, Cox GM, 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.

Liksitwattanukul S, Poneprasert B, Sirisanthana V 2004. Cryptococcosis in HIV-infected children Southeast Asian. *Trop Med Public Health* 35:935-939.

Lima EO, Gompertz AF, Paulo MQ, Giesbrecht AM 1992. *In vitro* antifungal activity of essential oils against clinical isolates of dermatophytes. *Rev Microbiol* 23: 235-238.

Lima MEL, Cordeiro I, Young MCM, Sobra MEG, Moreno PRH 2006 Antimicrobial activity of the essential oil from two specimens of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum (myrtaceae) native from São Paulo state - Brazil *Pharmacologyonline* 3: 589-593.

Limberger RP, Apel MA, Sobral M, Schapoval ES, Henriques A 1998. Investigação da atividade antimicrobiana do óleo volátil de espécies da família Myrtaceae. *Revista Brasileira de Farmácia* 79: 49-52.

Lin X, Heitman J 2006 The biology of *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annual Review of Microbiology* 60:60-105.

Lindenberg ASC, Chang MR, Paniago AMM, Lazéra MS, Moncada PMF, Bonfim GF, Nogueira SA, Wanke B. 2008. Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 50: 75-78.

Litvintseva AP, Kestenbaum L, Vilgalys R, Mitchell, TG 2005. Comparative analysis of environmental and clinical populations of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 43: 556-64.

Lugarin C, Goebel CS, Condas LAZ, Muro MD, Farias MR, Ferreira FM, Vainstein MH 2008. *Cryptococcus neoformans* Isolated from Passerine and Psittacine bird excreta in the State of Paraná Brazil *Mycopathologia* 166:61-69.

MacDougall Laura, Kidd SE, Galanis E, Mak S, Leslie MJ, Cieslak PR, Kronstad JW, Morshed G, Bartlett KH 2007. "Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific Northwest, USA," *Emerging Infectious Diseases* 13: 42-50.

Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Jr VF, Grynberg NF, Echevarria 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova* 25: 429-438.

Mandal Piyali, Roy TS, Das TK, Banerjee U, Xess I, Nosanchuk JD 2007. Differences in the cell wall architecture of melanin lacking and melanin producing *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from India: an electron microscopic study *Brazilian Journal of Microbiology* 38: 662-666.

Martinez R 2006. An update on the use of antifungal agents. *J Bras Pneumol* 32: 449-60.

Martinez LR & Casadevall A 2006. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal Agents *in vitro Antimicrob Agents Chemoth* 50: 1021-1033.

McFadden D, Zaragoza O, Casadevall A 2006. The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol* 14: 497-505.

Mednick AJ, Nosanchuk JD, Casadevall A. 2005. Melanization of *Cryptococcus neoformans* affects lung inflammatory responses during cryptococcal infection. *Infect Immun* 73: 2012-2019.

Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E 2003. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerging Infectious Disease* 9: 189-95.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL - Dados e pesquisa em DST e AIDS. Coordenação do programa nacional de DTS/AIDS. Brasília, 2002. (site: [www.aids.gov.br](http://www.aids.gov.br)).

Missall TA, Cherry-Harris JF, Lodge JK 2005 Distinct stress responses of two functional laccases in *Cryptococcus neoformans* are revealed in the absence of the thiol-specific antioxidant Tsa1. *Eukaryotic Cell* 4:202-208.

Mitchell AP 2003. Guest Commentary up dated view of *Cryptococcus neoformans* mating type and virulence. *Infect Immun* 71: 4829-4830.

Mitchell TG, Perfect JR 1995. Cryptococcosis in the era of AIDS -100 yearsafter the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Review* 8: 515-548.

Moreira TA, Ferreira MS, Ribas RM, Borges AS 2006 Cryptococcosis: clinical epidemiological laboratorial study and fungi varieties in 96 patients. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 255-258.

Morais SM, Cantunda-Junior FEA, Silva ARA, Martins Neto JS 2006 Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de Croton do nordeste do Brasil, *Quim Nova*. 29:907-910.

Moretli ML, Resende MR, Lazéra MS, Colombo AL, Shikanai-Yasuda MA 2008. Consenso em criptococose Relatório Técnico Technical Report. *Rev Soc Bras Med Trop* 41: 524-44.

Moyrandy F, Klaproth B, himmelreich U, Dromer F, janbon G 2002. Isolation and characterization of capsule sttructure mutant strains of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 45: 837-849

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.

Mwaba P; Mwansa J; Chintu C; Pobee J; Scarborough M; Portsmouth S; Zumla A 2001. Clinical presentation, natural history and cumulative death rates of 230 adults with primary cryptococcal meningitis in Zambian AIDS patients treated under local conditions. *J Postgrad. Med* 77:769-773.

Ngamskulrungrroj P; Meyer Wieland 2009. Melanin production at 37°C is linked to the high virulent *Cryptococcus gattii* Vancouver Island outbreak genotype VGIIa *Australasian Mycologist* 28: 9–15.

Nishikawa MM, Lazera MS, Barbosa GG, Trilles L, Balassiano BR, Macedo RC, Bezerra CC, Perez MA, Cardarelli P, Wanke B 2003. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* 40 isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. *J Clin Microbio* 41: 73-77.

Nosanchuk JD, Casadevall A 2003. Budding of melanized *Cryptococcus neoformans* in the presence or absence of L-dopa. *Microbiology* 149: 1945-1951.

Nosanchuk JD, Casadevall A 2006. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrob Agents Chem* 50: 3519–3528.

Nosanchuk JD, Shoham S, Fries BC, Shapiro DS, Levitz SM, Casadevall A 2000. Evidence of zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a pet cockatoo to an immunocompromised patient. *Ann Intern Med* 32: 205-208.

Odom A, Muir S, Lim E, Toffaletti DL, Perfect J, Heitman, J 1997. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J* 16:2576–2589.

Offiah VN, Chikwendu UA 1999. Antidiarrhoeal effects of *O. gratissimum* leaf extract in experimental animals. *J Ethnopharmacol* 68: 327-330.

Ohkusu M, Tangonan N, Takeo K, Kishida E, Ohkubo M, Aoki S, Nakamura K, Fujii T, Siqueira IC, Maciel EAP, Sakabe S, Almeida GMD, Heins-Vaccari EM, Lacaz CS 2002. Serotype, mating type and ploidy of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from patients in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 44: 299-302.

Oliveira MTB, Boekhout T, Theelen B, Hagen F, Baroni FA, Lazera MS, Lengeler KB, Heitman J, Rivera ING Paula RC 2004. *Cryptococcus neoformans* Shows a Remarkable Genotypic Diversity in Brazil *J Clin Microb* 42: 1356–1359.

Okabayashi K, Hasegawa A, Watanabe T 2007. Capsule associated genes of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 163: 1-8.

Oliveira MM, Gilbert B, Mors WB 1968. Triterpenes in *Caryocar brasiliensis*. *Acad Brasil Cienc* 40: 451-452.

Osuna A, Carragoso A, Lemos A, Mocho ML, Gaspar O 2008. Criptococose. *Acta Medica Portuguesa* 21: 307-313.

Pappalardo MCSM, Melhem MSC 2003. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 45: 299-305.

Park BJ, Wannemuehler KA, Marston, BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM 2009. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 23: 525-530.

Pfaller MA, Yu WL. 2001. Antifungal susceptibility testing. New technology and clinical applications. *Infect Dis Clin N Am* 15: 1227-1261

Passos XS; Santos SC; Ferri PH; Fernandes OFL; Paula TF; Garcia ACF; Silva MRR 2002. Atividade antifúngica do *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 623-627.

Passos XS, Castro AC, Pires JS, Garcia ACF, Campos FC, Fernandes OFL, Paula JR, Ferreira HD, Santos SC, Ferri PH, Silva MRR 2003. Composition and antifungal activity of the essential oils of *Caryocar brasiliensis*. *Pharm Biology* 41: 321-326.

Paula TF, Garcia ACF, Oliveira CMA, Martinez RC, Silva MRR 2001. Propriedades antifúngicas de *Hyptis ovalifolia* sobre *Cryptococcus neoformans*. Resumo dos Anais do XIII Encontro Científico dos Acadêmicos de Medicina 21 p.

Paula JAM, Bara MTF, Rezende MH, Ferreira HD, Paula JR 2005. Estudo farmacognóstico das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum – Myrtaceae. *Revista Eletrônica de Farmácia* 2: 153-156.

Paula JAM, Paula JR, Bara MTF, Rezende MH, Ferreira HD 2008. Estudo farmacognóstico das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum - Myrtaceae *Rev. Bras. Farmacogn. Braz J. Pharmacogn* 18: 265-278.

Pereda-Miranda R, Delgado G 1990. Chemical studies on Mexican *Hyptis* species. Part 2. Triterpenoids and flavonoids from *Hyptis albida*. *J Natural Products* 53: 182-185.

Perfect JR, A. Casadevall 2002 “Cryptococcosis.” *Infectious Disease Clinics of North America* 16: 837-874.

Perfect JR 2006. MINI REVIEW: *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot *FEMS Yeast Res* 6:463–468.

Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, Harrison TS, Larsen RA, Lortholary O, Nguyen M-H, Pappas PG, Powderly WG, Singh N, Sobel JD, Sorrell TC 2010. Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* 50: 291–322

Pietrella D, Corbucci C, Perito S, Bistoni G, Vecchiarelli A 2005. Mannoproteins from *Cryptococcus neoformans* promote dendritic cell maturation and activation. *Infect Immun* 73: 820-827.

Plonka PM and Grabacka M 2006. Review Melanin synthesis in microorganisms — biotechnological and medical aspects. *Acta Biochimica Polonica* 53: 429-443.

Price MF;Wilkinson ID; gentry IO 1982. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20: 15-20.

Ratter JA, Ribeiro JF, Bridgewater 1997. The brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Ann Bot* 80: 223-230.

Rehder VLG, Machado ALM, Dermelina C, Sartoratto A, Duarte MCT, Figueira GM 2004. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de duas espécies de *Origanum*. *Rev Bras Plan Med* 6: 67-71.

Refojo N, Perrotta D, Brudny M, Abrantes R, Hevia AI, Davel G 2009. Isolation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from trunk hollows of living trees in Buenos Aires City, Argentina. *Medical Mycology* 47; 177-184.

Rex JH; Pfaller MA; Walsh TJ; Chaturvedi V; Espinel-Ingroff A; Ghannoum MA; Gosey LL; Odds FC, Rinaldi MG; Sheehan DJ; Warnock DW 2001. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microb Rev* 14:643-658.

Ribeiro LC; Hahn RC; Favalessa OC; Tadano T; Fontes CJF 2009. Systemic mycosis: factors associated with death among patients infected with the human immunodeficiency virus, Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil, 2005-2008. *Rev Soc Bras Med Trop* 42: 698-705.

Rodero L, Mellado E, Rodriguez AC, Salve Â, Guelfand L, Cahn P, Cuenca-Estrella M, Davel G, Rodriguez-Tudela JL 2003. G484S amino acid Substitution in lanosterol 14- $\alpha$  demethylase (*ERG11*) is related to fluconazole resistance in a recurrent *Cryptococcus neoformans* clinical isolate. *Antim Agents Chem* 47: 3653–3656.

Rodrigues ML; Nakayasu ES; Oliveira DL; Nimrichter L; Nosanchuk JD; Almeida IC; Casadevall A 2008. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryotic Cell* 7: 58–67.

Saag MS, Graybill RJ, Larsen RA, Pappas PG, Perfect JR, Powderly WG, Sobel JD, Dismukes WE 2000. Practice guidelines for the management of Cryptococcal disease. *Clin Infect Dis* 30: 710-718.

Sanglard D 2002. Importancia clínica de los mecanismos de resistencias a los antifúngicos en las levaduras. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 20: 225-234.

Sanglard D, Odds FC 2002 Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *The Lancet Infectious Diseases*, 2: 73-85.

Sanglard D 2003. Resistance and tolerance mechanisms to antifungal drugs in fungal pathogens. *Mycologist* 17: 74-78.

Sanguinetti M, Posteraro B, La Sorda M, Torelli R, Fiori B, Santangelo R, Delogu G, and Fadda G 2006. Role of *AFRI*, an ABC transporter-encoding gene, in the *in vivo* response to fluconazole and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 74: 1352-1359.

Santangelo R, Zoellner H, Sorrell T, Wilson C, Donald C, Djordjevic J, Shounan Y, Lesley W 2004. Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of *Cryptococcus* in a murine model. *Infect Immun* 72: 2229–2239.

Santos WRA, Meyer W, Wanke B, Costa Solange PSE, Trilles L, Nascimento JLM, Medeiros R, Morales BP, Bezerra CC, Macêdo RCL, Ferreira SO, Barbosa GG, Perez MA, Nishikawa MM, Lazéra MS 2008. Primary endemic *Cryptococcosis gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro 103: 813-818.

Sartori MRK 2005. Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores de *Acmela brasiliensis* spreng (*Wedelia paludosa*) (Asteraceae). Tese de Mestrado da Universidade do Vale do Itajaí.

Satishchandra P, Gadre TMG, Nagarathna S, Chandramukhi A, Mahadevan A, Shankar SK 2007. Cryptococcal meningitis: Clinical, diagnostic and therapeutic overviewa. *Neurology India* 55: 226-232.

Scalbert, A 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, Chichester, 30:3875-3883.

Schapoval EES, Silveira SM, Miranda ML, Alice CB, Henriques AT 1994. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora*. *J Ethnopharmacol* 44: 137-142.

Schiave LA, Pedroso RS, Candido RC, Roberts DW, Braga GUL 2009. Variability in UVB tolerances of melanized and non melanized cells of *Cryptococcus neoformans* and *C. laurentii*. *Photochemistry and Photobiology* 85:205–213.

Shrestha RK, Stoller JK, Honari G, Procop GW, Gordon SM 2004. Pneumonia due to *Cryptococcus neoformans* in a patient receiving infliximab: possible zoonotic transmission from a pet cockatiel. *Respir Care* 49:606-608.

Silva JMC, Bates JM 2002. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a tropical hotspot. *BioScience* 52: 225-233.

Silva MV, Costa TR, Costa MR, Ferreira EC, Fernandes OFL, Santos SC, Lião LM, Ferri PH, Paula JR, Ferreira HD, Silva MRR 2001. Growth inhibition effect of brazilian cerrado plant extracts on *Candida* species. *Pharmaceutical Biology* 39: 138-141.

Silva MRR, Oliveira JG, Fernandes OFL, Passos XS, Costa CR, Souza LKH, Lemos JA, Paula JR 2005. Antifungal activity of *Ocimum gratissimum* towards dermatophytes. *Mycoses* 48: 172-175.

Sivasangeetha K, Harish BN, Sujatha S, Parija SC, Dutta TK 2007. Cryptococcal meningoencephalitis diagnosed by blood culture. *Indian J Med Microbiol* 25: 282-284.

Soares MCB, Paula CR, Dias ALT, Caseiro MM, Costa SOP 2005. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. *Rev Inst Med Trop S. Paulo* 47: 31-36.

Souza LKH, Oliveira CMA, Ferri PH, Santos SC, Oliveira Júnior JG, Miranda ATB, Lião LM, Silva MRR 2002. Antifungal properties of brazilian cerrado plants. *Brazilian Journal of Microbiology* 33: 247-249.

Souza LKH, Oliveira CMA, Ferri PH, Oliveira Junior JG, Souza Junior AH, Fernandes OFL, Silva MRR 2003. Antimicrobial activity of *Hyptis ovalifolia* towards dermatophytes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 963-965.

Souza, ACM 2006. Propriedades antifúngicas de *Aspidosperma ramiflorum* sobre dermatófitos e *Cryptococcus neoformans*. Trabalho de especialização em Microbiologia apresentado ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.

Souza LKH; Fernandes OFL; Kobayashi CCBA; Passos XS; Costa CR; Lemos JA; Souza-Júnior AH; Silva MRR 2005. Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Goiânia city, Goiás, Brazil. *Rev Inst Med Trop S. Paulo* 47: 253-256.

Souza LKH. Variabilidade fenotípica e genotípica de isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans* obtidos na cidade de Goiânia – GO Tese de Doutorado. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – Universidade Federal de Goiás-Goiânia, Goiás, 2006.

Steenbergen JN, Casadevall, A 2003. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infec* 5: 667-675.

Steinbach WJ, Reedy JL, Cramer RA Jr, Perfect JR, Heitman J 2007 Harnessing calcineurin as a novel anti-infective agent against invasive fungal infections. *Nat Rev Microbiol* 5: 418-30.

Subramanian S, Mathai D 2005. Review Article Clinical manifestations and management of Cryptococcal infection. *J Postgrad Med* 51: S21-26.

Tintelnot K, Lemmer K, Losert H, Schär, G, Polak 2004. A Follow-up of epidemiological data of cryptococcosis in Austria, Germany, and Switzerland with special focus on the characterization of clinical isolates. *Mycoses* 47: 455-464.

Tscharke RL, Lazera M, Chang YC, Wickes BL, Kwon-Chung KJ 2003. Haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans* is not mating type alpha-specific. *Fungal Genet Biol* 39: 230-237.

Urán ME, Cano LE 2008 Melanina: implicaciones en la patogénesis de algunas enfermedades y su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero; Melanin: implications in some disease pathogenesis and its capacity to evade the host immune. *Asociación Colombiana Infectología* 12: 357-377.

Vaishnav VV, Bacon BE, O'Neill O, Cherniak R 1998. Structural characterization of the galactoxylomannan of *Cryptococcus neoformans* Cap 67. *Carbohydr Res* 306: 315-330.

van Duin D, Casadevall A, Nosanchuk JD 2002. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibility to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 3394-3400.

van Duin D, Cleare W, Zaragoza O, Casadevall A, Nosanchuk JD 2004. Effects of Voriconazole on *Cryptococcus neoformans* *Antimicrobio Agents Chem* 48: 2014–2020.

Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, Fink MCDS, Pannuti CS, Trujillo JR 2008. AIDS related progressive multifocal leukoencephalopathy: A retrospective study in a referral center in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*, 50: 209-212.

Vidotto, V., A. Sinicco, D. Di Fraia, S. Cardaropoli, S. Aoki, and S. Ito-Kuwa. 1997. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 136:119–123.

Vieira RF, Martins MVM 1998. Estudos etnobotânicos de espécies medicinais de uso popular no cerrado. In: Proc Int Savana Symposium, Brasilia, DF, Embrapa/ CPAC 169-171p.

Viviani MA, Cogliati M, Esposto MC, Lemmer K, Tintelnot K, Colom VMF, Swinne D, Velegraki A, Velho R and the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) 2006. Cryptococcosis working group. Molecular analysis of 311 *Cryptococcus neoformans* isolates from a 30-month ECMM survey of cryptococcosis in Europe. *FEMS Yeast Res* 6:614-619.

Yamagishi T, Zhang C, Chang JJ, Mcphail DR, Mcphail A T, Lee KH 1988. Antitumor agents. Part 94. The cytotoxic principles of *Hyptis capitata* and the structures of the new triterpenes hyptatic acid A and B. *Phytochemistry* 27: 3213-3216.

Wakamatsu K, Ito S 2002. Advanced Chemical Methods in Melanin Determination. *Pigment Cell Research* 15: 174-183.

Wang Y, Aisen P, Casadevall A 1996. Melanin, melanin “ghosts”, and mela composition in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 64 2420–2424.

Wang P, Nichols CB, Lengeler KB, Cardenas ME, Cox GM, Perfect JR, Heitman J 2002. Mating-Type-Specific and Nonspecific PAK Kinases Play Shared and Divergent Roles in *Cryptococcus neoformans* *Eukaryotic Cell*. 1: 257-272.

Waterman SR, Hacham M, Panepinto J, Hu G, Shin S, Williamson PR 2007. Cell wall Targeting of laccase of *Cryptococcus neoformans* during infection of mice. *Infection and Immunity* 75: 714-722.

Wickes BL, Mayorga ME, Edman U, Edman JC 1996. Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: Association with the a-mating type (monokaryotic/dikaryotic/clamp connection/hyphae) *Microbiology* 93: 7327-7331.

Williamson PR 1994 Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *J Bacteriol* 176: 656–664.

Wormley Jr FL, Perfect JR 2005. Immunology of infection caused by *Cryptococcus neoformans*. *Methods Mol Med* 118: 192-198.

Wright LC, Payne J, Santangelo RT, Simpanya MF, Chen SCA, Widmer F, Sorrell TC 2004. Cryptococcal phospholipases: a novel lysophospholipase discovered in the pathogenic fungus *Cryptococcus gattii*. *Biochem J* 384: 377-384.

Xu J, Mitchell TG 2003. Comparative gene genealogical analyses of strains of serotype AD identify recombination in populations of serotypes A and D in the human pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 149: 2147-2154.

Zaragoza O, Casadevall A 2004. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. *Biol Proced Online* 6: 10-15.

Zaragoza O, Mihiu C, Casadevall A, Nosanchuk JD 2005. Effect of Amphotericin B on Capsule and Cell Size in *Cryptococcus neoformans* during Murine Infection. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 49:4358-4361.

Zaragoza O, Cuenca-Estrella M, Regadera J, Tudela JLR 2008. The Capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* paradoxically inhibits invasive growth. *The Open Mycology Journal* 2: 29-39.

Zaragoza O, Rodrigues ML, De Jesus , Frases, Dadachova E, Casadevall A 2009. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol* 68: 133-216.

Zhu X, Williamson PR 2006. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Research* 5: 1-10.

Anexos:

Manuscrito enviado para publicação na revista **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**

Artigo: Effects of Voriconazole, Amphotericin B and *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum on the capsule and cell wall of *Cryptococcus neoformans*.

Normas para publicação na revista *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*

Protocolo da Comissão de Ética e Pesquisa