

PAULO ROBERTO DA SILVA

SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS E RESPOSTA  
IMUNOLÓGICA *IN VITRO* ÀS VARIEDADES DO  
*Cryptococcus neoformans*.

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia, área de concentração em Patologia Clínica, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. David Nascimento Silva Teixeira  
Co-orientador: Profa. Dra. Ana Paula Sarreta Terra

**Outubro/2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

## FICHA CATALOGRÁFICA

S582s Silva, Paulo Roberto da  
Susceptibilidade a antifúngicos resposta imunológica *in vitro* às variedades de *Cryptococcus Neoformans* / Paulo Roberto da Silva - 2006  
137 f. ;trab.; Graf.; fig.

Tese Mestrado em Patologia -  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG,  
2006.

Orientador: Prof. Dr. David Nascimento Silva Teixeira

1.CRIPTOCOCOSE. 2.CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS.

3.SUSCEPTIBILIDADE-. 4.RESPOSTA IMUNE. I. TITULO. II.

SILVA-TEIXEIRA, DAVID NASCIMENTO.

Este trabalho foi realizado nos laboratórios da disciplina de Laboratório Clínico e disciplina de Microbiologia da UFTM e nos Laboratórios de Imunologia e Bioquímica e Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Este trabalho contou com o apoio financeiro da FAPEMIG e UFTM.

**Dedicatória**

Aos meus Pais, José Euripedes e Iraci, que  
sempre me deram amor, ensinamentos de  
perseverança, honestidade e respeito ao próximo,  
e à minha filha nandinha, por confiar em min.

À minha esposa Cíntia, pela  
confiança, apoio e compreensão  
nos momentos mais difíceis deste  
estudo.

## **Agradecimientos**

A Deus, por ter me proporcionada realização e conclusão deste estudo.

Ao meu orientador David pela orientação desta tese, amizade, apoio nos momentos de dificuldade, dedicação, calma, estando sempre disponível quando eu precisava, colaborando com todas as etapas do trabalho. Obrigado pelos ensinamentos transmitidos de sua experiência em pesquisa e ensino. E também pelo exemplo de pesquisador e professor que demonstrou ser durante o curso deste trabalho.

À Ana Paula pela ajuda para desenvolver este trabalho e incentivo contínuo à pesquisa, dedicação, sempre presente, obrigado pela amizade e confiança em mim depositada. Obrigado por ter me apresentado ao David que é um exemplo de pessoa a ser seguido.

À disciplina de microbiologia por ter me proporcionado este estudo, aos professores Adriana e André, pelo incentivo, me dispensando quando necessário para cursar disciplinas e desenvolver meus trabalhos de pesquisa, aos meus colegas de trabalho, Sônia, Miguela, Leila e Sueli, pelo companheirismo e compreensão durante este trabalho.

À disciplina de laboratório clínico, que através dos funcionários, Regina, meu tio Rubens, e a Renata que sempre que precisei estavam prontos a colaborar com o trabalho.

Ao serviço de patologia clínica por ter me cedidos às amostras de LCR, principalmente o José Wilson, e todos do setor que colaboraram com este trabalho.

Ao Instituto de Doenças Tropicais da Universidade de Goiás, principalmente à Professora Orionalda de Fátima Lisboa Fernandes que com toda presteza me orientou para identificar e realizar os testes de susceptibilidade e ainda me cedendo amostras controles.

Ao laboratório de Bioquímica e Imunologia da UFMG através da Dra. Miriam e ao Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Dr. Alfredo, ambos da UFMG, que me proporcionaram realizar parte deste trabalho nos seus laboratórios.

Ao meu professor de inglês João Francisco pelos ensinamentos e apoio prestados durante esse trabalho.

Aos meus irmãos, pela a confiança depositada em min.

Agradeço todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

Item	Página
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de abreviaturas	
Introdução	20
Epidemiologia	22
Agente etiológico	23
Classificação das variedades de <i>C. neoformans</i>	24
Manifestações clínicas	26
Diagnóstico laboratorial	28
Susceptibilidade a antifúngicos	30
Resposta imune ao <i>C. neoformans</i>	33
Objetivos	45
Justificativa	47
Hipótese	49
Material e métodos	51
Amostras biológicas de pacientes com criptococose	52
Identificação e isolamento das variedades de <i>Cryptococcus neoformans</i>	52
Teste de susceptibilidade aos antifúngicos	54
Cultivo e preparo do inóculo das variedades de <i>Cryptococcus neoformans</i>	54
Preparo e diluições dos agentes antifúngicos	54
Cultivo de amostras de <i>C. neoformans</i> para estimulação de leucócitos	57
Obtenção de amostras de sangue periférico de indivíduos voluntários saudáveis	57
Ensaio de estimulação de leucócitos em sangue total	57
Isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)	58
Ensaio de estimulação com variedades de <i>Cryptococcus neoformans</i>	58
Produção de radicais livres de oxigênio (ERO) por granulócitos humanos	59
Fagocitose de variedades de <i>C. neoformans</i> por granulócitos humanos	60
ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”)	60
Dosagem de nitrito/nitrato	62
Condições livres de endotoxina	62
Aspectos éticos	63

Análise estatística	63
Resultados	64
Discussão	87
Conclusão	103
Resumo	105
Abstract	109
Referências bibliográficas	112

**Lista de figuras**

Figura	Página
Figura 1 - Pesquisa direta para fungo encapsulado pela coloração da tinta nanquim	53
Figura 2 - Cultivo de <i>C. neoformans</i> em ágar Sabouraud dextrose	53
Figura 3 - Prova bioquímica para teste de uréase para identificação do <i>C. neoformans</i>	53
Figura 4 - Prova bioquímica da L-CGB para identificação da variedade de <i>C. neoformans</i>	53
Figura 5 – Teste de susceptibilidade em placa de microtitulação para avaliar CIM aos antifúngicos	56
Figura 6 - Sorologia para HIV de pacientes com criptococose atendidos no HE-UFTM no período de dezembro de 2001 a julho de 2005	66
Figuras 7 - Distribuição por sexo dos pacientes com criptococose atendidos no HE-UFTM no período de dezembro de 2001 a julho de 2005	66
Figura 8 - Faixa etária dos pacientes com criptococose atendidos no HE-UFTM no período de dezembro de 2001 a julho de 2005	66
Figuras 9 - Susceptibilidade <i>in vitro</i> de isolados de <i>C. neoformans</i> ao cetoconazol avaliada pelo método de microdiluição em caldo	69
Figuras 10 - Susceptibilidade <i>in vitro</i> de isolados de <i>C. neoformans</i> ao fluconazol avaliada pelo método de microdiluição em caldo	70
Figuras 11 - Susceptibilidade <i>in vitro</i> de isolados de <i>C. neoformans</i> ao itraconazol avaliada pelo método de microdiluição em caldo	71
Figura 12 - Susceptibilidade <i>in vitro</i> de isolados de <i>C. neoformans</i> a anfotericina-B avaliada pelo método de microdiluição em caldo	72

Figura 13 - Produção de TNF $\alpha$ por leucócitos de sangue total humano obtido de doadores voluntários saudáveis após estimulação <i>in vitro</i> com variedades de <i>C. neoformans</i>	77
Figura 14 - Produção de TNF $\alpha$ por células mononucleares humanas obtidas de doadores voluntários saudáveis após estimulação <i>in vitro</i> com variedades de <i>C. neoformans</i>	77
Figura 15 - Produção de IL-10 por leucócitos de sangue total humano obtido de doadores voluntários saudáveis após estimulação <i>in vitro</i> com variedades de <i>C. neoformans</i>	78
Figura 16 - Produção de IL-10 por células mononucleares humanas obtidas de doadores voluntários saudáveis após estimulação <i>in vitro</i> com variedades de <i>C. neoformans</i>	79
Figura 17 - Produção de IFN $\gamma$ por leucócitos de sangue total humano obtido de doadores voluntários saudáveis após estimulação <i>in vitro</i> com variedades de <i>C. neoformans</i>	80
Figura 18 - Produção de IFN $\gamma$ por células mononucleares humanas obtidas de doadores voluntários após estimulação <i>in vitro</i> com variedades de <i>C. neoformans</i>	81
Figura 19 - Produção de óxido nítrico por leucócitos de sangue total obtidos de doadores voluntários saudáveis após estimulação <i>in vitro</i> com variedades de <i>C. neoformans</i>	83
Figura 20 - Produção de óxido nítrico por células mononucleares obtidas de doadores voluntários saudáveis após estimulação <i>in vitro</i> com variedades de <i>C. neoformans</i>	84
Figura 21 – Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) por granulócitos de doadores voluntários saudáveis após estimulação <i>in vitro</i> com variedades de <i>C. neoformans</i>	85

## **Lista de Tabelas**

Tabela	Página
Tabela I - Distribuição das amostras de <i>C. neoformans</i> quanto ao local de isolamento e variedades encontradas	65
Tabela II - Susceptibilidade à antifúngicos de variedades de <i>C. neoformans</i> isoladas de pacientes do HE-UFTM	73
Tabela III - Susceptibilidade <i>in vitro</i> de isolados de <i>C. neoformans</i> aos antifúngicos, cetoconazol, fluconazol, itraconazol e anfotericina B avaliada pelo método de microdiluição em caldo, com relação ao local de isolamento	74
Tabela IV - Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) por granulócitos de doadores voluntários saudáveis após estimulação <i>in vitro</i> com variedades de <i>C. neoformans</i>	86

## **Lista de abreviaturas e siglas**

Notação	Significado
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Humana
CBS 132	“Central Bureau Schimmel Cultures”
CGB	L-Canavanina Glicina Bromotimol
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CLSI	“Clinical and Laboratory Standards Institute”
CNA	<i>C. neoformans</i> variedade <i>neoformans</i> sorotipo A
CNB	<i>C. neoformans</i> variedade <i>gattii</i> sorotipo B
DST	Doença sexualmente transmissível
dL	decilitro
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimático (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”)
ERO	Espécies reativas de oxigênio
g	força g (gravitacional)
GalXM	Galactoxilomanana
GXM	Glucoronoxilomanana
HE	Hospital Escola
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IL	Designação genética para Interleucina
IP-10	Proteína induzida 10 (Índucible protein-10”)
kDa	quilodalton
Kg	quilograma
KOH	Hidróxido de potássio
LBA	Lavado broncoalveolar
LCR	Líquido céfalo-raquidiano
L-CGB	L-canavanina, glicina e azul de bromotimol
LPS	Lipopolissacarídeo
NCCLS	“National Committee for Clinical Laboratory Standards”

MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos (“Monocyte Chemoattractant Protein-1”)
MIG	Monocina induzida por interferon-gama (“Monokine Induced by gamma interferon”)
MIP-1 $\alpha$	Proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa (“Macrophage Inflammatory Protein-1 alfa”)
$\mu\text{m}$	micrômetros
mg	miligramas
$\mu\text{g}$	micrograma
mL	mililitro
$\text{mm}^3$	milímetro cúbico
NK	Células matadoras naturais (“Natural Killer”)
NO	Óxido nítrico (“Nitric Oxide”)
NOS	Enzima sintetizador do óxido nítrico (“Nitric Oxide Synthase”)
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico “Peripheral Blood Mononuclear Cells”
PBS	Tampão salina fosfato (“Phosphate Buffered Saline”)
Pg	picograma ( $10^{-12}$ gramas)
PHA	Fitohemaglutinina A (“Phytohemagglutinin A”)
RANTES	Proteína regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais (“Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted”)
ROS	“Reactive Oxygen Species” (espécies reativas de oxigênio).
RPMI	Meio de cultura desenvolvido pelo Roswell Park Memorial Institute
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida
SNC	Sistema Nervoso Central
Th	Linfócito T auxiliar (T “helper”)
Th1	Linfócito T auxiliar (T “helper”) do tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar (T “helper”) do tipo 2

TGF- $\beta$	Fator de crescimento e transformação beta (“Tranforming Growth Factor – $\beta$ ”)
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa (“Tumor Necrosis Factor $\alpha$ ”)
Tr-1	Células T regulatórias 1 (“T regulatory 1”)
UFGO	Universidade Federal de Goiás
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Var	Variedade

## **Introdução**

Estima-se que existam entre 100.000 a 1.000.0000 de espécies de fungos habitando o nosso planeta. Esta ubiquidade dos fungos no meio ambiente propiciou o desenvolvimento de diversos mecanismos de defesa antifúngicos inatos e adquiridos em hospedeiros multicelulares (LEVITZ, 2002; SHOHAM; LEVITZ, 2005). Dentro do gênero *Cryptococcus* existem 19 espécies conhecidas, sendo o *Cryptococcus neoformans*, o agente etiológico mais comum da criptococose humana. Este fungo foi identificado como patógeno humano em 1894 (BUSSE, 1894) e a partir de 1981 sua importância clínica aumentou drasticamente em virtude do aparecimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (MITCHELL; PERFECT, 1995; LACAZ, 2002). O *Cryptococcus neoformans* pode infectar animais, sendo extremamente rara a transmissão homem a homem (BEYT; WALTMAN, 1978; GLASER; GARDEN, 1985; MITCHELL; PERFECT, 1995; ALVES et al., 2001). A transmissão pode ocorrer através da inalação das formas infecciosas, células leveduriformes dessecadas e carregadas pelo ar ou provenientes de basidiósporos que se depositam facilmente nos alvéolos, comprometendo inicialmente o pulmão e podendo disseminar-se para outros órgãos, mesmo se a infecção primária for leve ou assintomática (POWELL; DAHL; WEEKS; TOSH, 1972; NEILSON; FROMTLING; BULMER, 1977; OLIVEIRA NETO et al., 1993; MITCHELL; PERFECT, 1995; BAKER; REBOLI, 1997; BARONI et al., 2006). Frequentemente pode ocorrer disseminação para o sistema nervoso central (TOLKOFF-RUBIN; RUBIN, 1992), uma vez que este órgão apresenta concentrações ótimas de tiamina, carboidratos, minerais e nutrientes assimiláveis pelo fungo, assim como a presença de percussores de melanina como dopamina e lacase (POLACHECK ; KWON-CHUNG, 1988; POLACHECK; PLATT ; ARONOVITCH, 1990 ; LIFSON et al., 2006). A criptococose é uma micose cosmopolita que vem assumindo um papel relevante, principalmente em meningites. É considerada uma infecção oportunista,

geralmente associada à imunodepressão e a pacientes acometidos de leucemia, câncer, diabetes, transplantados, em tratamento com corticosteróide ou infectados com o vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida, sendo pouco freqüente em pacientes com imunidade normal. Pacientes receptores de transplantes, em consequência ao uso de substâncias imunossupressoras, podem apresentar infecções fúngicas sistêmicas, como criptococose e histoplasmose, consideradas responsáveis pela elevação das taxas de mortalidade neste grupo de pacientes. A incidência de infecções fúngicas invasivas em receptores de rins é de 5%, enquanto que de fígado e pâncreas pode chegar a 20% (TOLKOFF-RUBIN et al., 1992; DELFINO et al., 1994; MITCHELL; PERFECT, 1995; LU et al., 2006)

Apesar dos diversos avanços terapêuticos ainda é considerado difícil o tratamento da criptococose em indivíduos severamente imunossuprimidos, podendo chegar até 25% a mortalidade neste grupo, sendo que muito dos sobreviventes poderão apresentar seqüelas neurológicas permanentes (ANAISSIE et al., 1989; DELFINO et al., 1994; MITCHELL; PERFECT, 1995; SHOHAM; HUANG; CHEN; GOLENBOCK; LEVITZ, 2001; LU et al., 2006)

### **Epidemiologia**

O *Cryptococcus neoformans* pode causar infecção em indivíduos hígidos, mas a maior proporção de humanos afetados são os indivíduos imunocomprometidos. Considerando as infecções oportunistas que acometem pacientes portadores de HIV, a criptococose é a segunda mais freqüente (CHUCK; SANDE, 1989; MITCHELL; PERFECT, 1995; CASALI et al., 2003). Em todo o mundo é estimado que 25% a 30% de indivíduos com SIDA têm como consequência a meningite por *Cryptococcus*. Sua incidência varia em diferentes partes do planeta apresentando-se entre 5 a 10% na Europa Ocidental e Estados Unidos e mais de 20% na África Central e leste da Ásia

(MITCHELL; PERFECT, 1995; MENTZ, et al 2001; LIFSON et al., 2006). O número crescente de pacientes portadores de HIV no Brasil favorece ao aumento das infecções causadas por este fungo patogênico. De acordo com a Coordenação Nacional de DST/AIDS do Ministério da Saúde, no período de 1980 a 1997, 4,3% das infecções oportunistas associadas com pacientes HIV positivos foram causadas pelo *C. neoformans* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998).

### **Agente etiológico**

O *Cryptococcus neoformans*, é uma levedura ovalada com aproximadamente 3 a 7 µm de diâmetro envolto por uma cápsula de polissacarídeos que varia de 1-3 µm de espessura, principal responsável por sua virulência e também por diversos efeitos inibitórios sobre a resposta imune (RIPON, 1988; JANBON, 2004). A cápsula do *Cryptococcus neoformans* é composta por 90% de glucoronoxilomanana (GXM), 7% de galactoxilomanana (GalXM) e 3 % de manoproteínas, (MOYRAND; KLAPROTH; HIMMELREICH; DROMER; JANBON, 2002). O estado leveduriforme corresponde à forma assexuada desse fungo e sua reprodução ocorre por brotamento. Entretanto, esse microorganismo também pode se reproduzir sexuadamente, correspondendo ao estado perfeito, sendo denominado de *Filobasidiella neoformans* (*C. neoformans* variedade *neoformans*), e *Filobasidiella bacillispora* (*C. neoformans* variedade *gattii*). A forma teleomórfica tem como característica principal a produção de basidiósporos e, ocasionalmente, pseudo-hifas (KWON-CHUNG, 1976; HORTA et al., 2002). Ambas as variedades de *C. neoformans* são heterotáticas na forma teleomórfica com dois tipos genótipos MATa e MATalfa (HEITMAN; ALLEN; ALSPAUGH ; KWON-CHUNG, 1999; BARONI et al., 2006).

Amostras de *C. neoformans* acapsulares não são patogênicas; por outro lado, existem espécies de *Cryptococcus* que produzem uma cápsula similar ao *C. neoformans*,

mas que não são patogênicas. Isto sugere que a cápsula é necessária, mas não suficiente para as células do fungo causarem a doença, e que a habilidade de provocar infecção também pode ser aumentada por outros fatores de virulência. Achados mostrando que, durante a criptococose humana podem ser isoladas amostras de *C. neoformans* acapsulares ou pobres em cápsulas, reforçam esta hipótese (KIMURA et al., 1997).

### **Variedades de *C. neoformans***

O *Cryptococcus neoformans* era classificado até 1999 em duas variedades, de acordo com os seus antígenos polissacarídeos capsulares, o *C. neoformans* variedade *neoformans* (sorotipos A, D e A D) e o *C. neoformans* variedade *gattii* (sorotipos B e C) (WILSON et al., 1968; KWON-CHUNG; POLACHEK ; BENNETT, 1982; DROUHET et al., 1997; NAKAMURA, 2001). A partir de 1999 foi relatado em um estudo, que devido a diferenças genéticas, o *C. neoformans* deveria ser reclassificado em três variedades: o sorotipo A, classificado como variedade *grubii*; os sorotipos B e C classificados como variedade *gattii* e os sorotipos D e AD como variedade *neoformans* (FRANZOT; SALKIN; CASADEVALL, 1999). Porém, estudos posteriores mostraram que não se deveria considerar a variedade *grubii* como uma variedade isolada, pois estudos de sorotipagem e análises de sequenciamentos genéticos não mostravam diferenças entre os sorotipos A, D, e AD, devendo o *C. neoformans* continuar sendo classificado apenas em duas variedades: a variedade *neoformans* (sorotipos A, D e AD), e a variedade *gattii* (sorotipos B e C) (DIAZ; BOEKHOUT; THEELEN ; FELL, 2000).

Existem diferenças importantes entre as variedades de *C. neoformans* com relação ao seu habitat natural e distribuição geográfica. A variedade *neoformans* tem como principal ambiente as fezes de pombos e outras aves. A concentração das leveduras nas excretas pode exceder o número de  $10^6$  organismos viáveis por grama. Sua concentração pode estar relacionada com a habilidade de assimilar xantina, ácido

úrico, uréia e creatinina, compostos abundantes nas fezes de aves, o que permite que o fungo sobreviva no material dessecado por vários meses (FROMTLING; BULMER, 1981). O primeiro isolamento ambiental da variedade *gattii* foi descrito em 1990 na Austrália associada a uma árvore nativa da região da espécie *Eucalyptus calmadulensis* e, em consequência, uma alta incidência desta variedade em indivíduos imunocompetentes também foi registrada (ELLIS; PFEIFFER, 1990). A infecção por *C. neoformans* var. *gattii* no norte da Austrália e em Papua-Nova Guiné, é comum e com risco de vida, sendo o tratamento prolongado e freqüentemente complicado (FISHER; BURROW; LO; CURRIE, 1993; SEATON; NARAQI; WEMBRI; WARRELL, 1996). O predomínio de *C. neoformans* var. *neoformans* também tem sido relatado na França, Itália e Bélgica, enquanto que a variedade *gattii* apresenta maior prevalência em regiões de climas tropicais e subtropicais (KWON-CHUNG; BENNETT, 1984). Na América Latina também existem descrições de isolamento de *C. neoformans* var. *gattii* (PASSONI; WANKE; NISHIKAWA; LAZERA, 1998; LICEA, et al., 1999). Recentemente, em 2003, foi relatado o primeiro isolamento ambiental da variedade *gattii* na Argentina em um parque localizado na cidade de Buenos Aires (DAVEL et al., 2003). Também foi relatado que o *C. neoformans* var. *neoformans* e o *C. neoformans* var. *gattii* estão presentes no meio ambiente urbano da cidade de São Paulo em lugares onde se reúnem normalmente grande numero de pessoas (MONTENEGRO ; PAULA, 2000). Embora a variedade *gattii* tenha sido encontrada com mais freqüência em zonas rurais e como causadora da criptococose em indígenas (ROZENBAUN et al., 1992), a detecção de *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii* na área urbana expõe regularmente a população à infecção por estas variedades, especialmente aqueles que apresentam algum grau de imunossupressão.

Existem diferenças no comportamento das variedades de *C. neoformans* que são

muito pouco compreendidas. A gravidade da doença e o seu prognóstico são dependentes em grande parte da integridade do sistema imune do hospedeiro e das características próprias de cada variedade. (COX et al., 2003; WORMLEY, JR.; HEINRICH; MILLER; PERFECT; COX, 2005; WORMLEY, JR.; PERFECT, 2005). O *C. neoformans* var. *gattii* é emergente como um patógeno primário, bioquímica e geneticamente diferente do *C. neoformans* var. *neoformans*. A variedade *gattii* difere da *neoformans* por ser capaz de causar doença em hospedeiros imunocompetentes. A infecção causada pelo *C. neoformans* var. *gattii* também é diferenciada da variedade *neoformans* devido o aumento na incidência de granulomas no pulmão e cérebro, aumentando a morbidade neurológica e ocorrendo baixa resposta a terapia com antifúngicos (SEATON et al., 1996; KWON-CHUNG; SORRELL; DROMER; FUNG ; LEVITZ, 2000). Nos indivíduos imunocomprometidos pela síndrome da imunodeficiência humana, o principal variedade encontrada como responsável pela criptococose tem sido a *neoformans* enquanto que nos imunocompetentes ocorre a predominância de *C. neoformans* variedade *gattii* (ELLIS; PFEIFFER, 1990).

### **Manifestações Clínicas**

A criptococose atinge principalmente indivíduos adultos, sendo rara na infância. A doença apresenta dois estágios: um primeiro delimitado ao sistema respiratório e um segundo onde há disseminação pela via hematogênica. O sistema respiratório é virtualmente a porta de entrada da infecção por *C. neoformans*, apesar da doença pulmonar sintomática não estar necessariamente presente quando a doença extrapulmonar for reconhecida, podendo assumir formas agudas, subagudas, crônicas, e apresentando-se de difícil diagnóstico sendo, às vezes, confundida com outras doenças pulmonares. É infrequente a criptococose cutânea primária e, mesmo nos casos

documentados, é difícil de excluir a presença de doença sistêmica. As manifestações cutâneas ocorrem em 10 a 15% dos casos e, na maioria das vezes, precede o surgimento da doença sistêmica (CONTRAN & ROBBINS, 1994; MITCHELL; PERFECT, 1995; HENRY, 1999).

As manifestações clínicas gerais da criptococose podem ser inespecíficas. Geralmente, os doentes relatam história crônica, com duração de semanas ou meses, caracterizada por febre baixa, anorexia e perda de peso. As manifestações específicas são polimorfas e variam com os órgãos afetados. A infecção pulmonar subclínica é a forma mais comum da criptococose, ainda que seja diagnosticada menos freqüentemente do que a meningite, por ser muitas vezes assintomática. Os sintomas da forma pulmonar, quando presentes, incluem febre variável, dor no peito, tosse, e a produção de escarro mucóide e sanguinolento. Os achados radiológicos são variáveis com áreas bem circunscritas de pneumonite comum. As lesões podem ser bilaterais ou comprometer apenas um lobo. Infiltrado difuso e doença miliar semelhante à tuberculose também são diagnosticados. Cavitação, fibrose e calcificação não são comuns (MITCHELL; PERFECT, 1995; HENRY, 1999; KAVANAUGH; FRASER; DIETRICH, 2006)

A infecção do cérebro e das meninges é a forma clínica mais importante, sendo também a mais relacionada com mortes em casos de criptococose. Em pacientes aids a neurocriptococose é muito insidiosa no início, com poucos sintomas meníngeos. Em alguns pacientes, no entanto, a infecção é muito mais abrupta no princípio, sendo a cefaléia o sintoma mais comum. O paciente procura assistência por causa de borramento de visão ou é encaminhado devido aos distúrbios mentais, tais como confusão, depressão, ou agitação (BRANDÃO et al., 2004). Febre, quando presente, é de intensidade baixa e os sinais típicos de irritação meníngea, como rigidez

de nuca e fotofobia, são pouco habituais e podem estar associados a náuseas e vômitos. O paciente imunocompetente com infecção por *C. neoformans* var. *gattii* tem tendência a apresentar lesões com massa pulmonar e/ou cerebral, e hidrocefalia (MITCHELL; PERFECT, 1995; HENRY, 1999).

### **Diagnostico laboratorial**

O diagnóstico laboratorial da criptococose é baseado no achado microscópico de leveduras encapsuladas coradas por tinta da china em amostras biológicas; no crescimento do *Cryptococcus neoformans* em cultura e na detecção do antígeno capsular em fluidos biológicos, sendo esta última mais sensível e rápida. Dentre as técnicas de identificação empregadas em estudos epidemiológicos, os testes de sorotipagem tornaram-se valiosos devido à associação da infecção com isolados dos sorotipos A em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (OHKUSU et al., 2002).

As culturas dos fungos provenientes de amostras biológicas são feitas em ágar Sabouraud e incubadas a 37°C de cinco a oito dias. O fungo apresenta um desenvolvimento rápido em meio de cultura com ou sem antibióticos. Devido à reprodução por gemulação, geralmente unipolar, são visualizadas ao microscópio células de diferentes tamanhos. Crescem colônias úmidas brilhantes, mucóides, cuja cor varia do branco-creme ao amarelo-marrom. As células de culturas que perderam a viscosidade e/ou de culturas após sucessivos repiques, mostram um pequeno envoltório capsular. A produção de material capsular é estimulada pela adição de 1% de solução de peptona ao meio de cultivo (LACAZ, 2002).

O *C. neoformans* e demais espécies do gênero não são fermentativas, possuindo, entretanto, capacidade assimilativa de carboidratos. A assimilação do inositol como

única fonte de carbono diferencia as espécies de *Cryptococcus* das espécies de *Rhodotorula*. O *C. neoformans* distingue-se das outras espécies de *Cryptococcus* que não assimilam o nitrato de potássio, por utilizar sacarose, maltose e dulcitol, não assimilando, entretanto, a lactose. A hidrólise da uréia é positiva (SIDRIN; ROCHA 2004). Através da produção de urease o *Cryptococcus neoformans* é capaz de hidrolisar a uréia em amônia e CO<sub>2</sub>. O indicador vermelho de fenol muda para a cor cereja (rosa escuro) na presença de produtos alcalinos caracterizando a positividade do teste (MAZA, 1999). O meio L-CGB (L-canavanina, glicina e azul de bromotimol) separa bioquimicamente as duas variedades de *C. neoformans*. O sorogrupo B/C utiliza a glicina e cresce em meio canavanina, tornando o meio azul cobalto. O sorogrupo A/D não cresce nesse meio de cultura permanecendo o mesmo inalterado em sua cor (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

Antígenos solúveis tornam-se rapidamente detectáveis no soro e no local da infecção: líquido cefalorraquidiano (LCR), lavado broncoalveolar (LBA) e urina. A detecção de antígenos pode ser determinada pelo teste de aglutinação de partículas de látex sensibilizadas com anticorpo monoclonal contra o polissacarídeo principal (GXM) da cápsula do *C. neoformans*. Esta técnica tem demonstrado sensibilidade superior a 90%, sendo especialmente indicada quando o exame direto e a cultura são negativos (ZAITZ, 1998). Títulos maiores ou iguais a 1:10 são considerados forte evidência de infecção ativa. A determinação antigênica durante a evolução da doença permite a avaliação do efeito terapêutico e o prognóstico da doença (HAMILTON; BARTHOLOMEW; FIGUEROA; FENELON; HAY, 1991).

## Susceptibilidade a antifúngicos

Vários são os métodos usados *in vitro* para avaliar a susceptibilidade dos fungos a diferentes quimioterápicos. As técnicas disponíveis consistem em adaptações executadas a partir dos métodos antibacterianos, e normalmente não são utilizados como rotina nos laboratórios de micologia. O aparecimento de infecções fúngicas recorrentes e a presença de resistência de determinadas leveduras à terapia usual estimularam o uso de testes de susceptibilidade para escolha e acompanhamento da quimioterapia antifúngica mais adequada (CALHOUN et al., 1986; WEY et al., 1988; BANERJEE et al., 1991; PROTÓN; QINDÓS, 1992; COLOMBO; BARCHIESI; MCGOUGH; RINALDI, 1995).

Técnicas como diluição em caldo, diluição e difusão em ágar, podem ser usadas em laboratório clínico para fornecer informações sobre a susceptibilidade do microrganismo em estudo. Nestes métodos utilizam-se vários parâmetros como tamanho do inóculo, concentrações definidas de agentes antifúngicos e diferentes condições que permitam o crescimento do microrganismo sem que haja interferência da atuação da droga (COLOMBO et al., 1995).

Uma grande variedade de agentes antifúngicos está disponível para o tratamento de micoses e encontram-se divididos em grupos, segundo seu mecanismo de ação (VANDEN et al., 1993). Dentre os antifúngicos, o grupo dos poliênicos apresenta como principais representantes, a nistatina isolada em 1949 por Hazen & Brown (1950) a partir de *Streptomyces noursei*, e a anfotericina B, descoberta por Gold (1956) e isolada de *Streptomyces nodosus* (TREJO; BENNETT, 1963). Os antifúngicos poliênicos agem ligando-se aos esteróis da membrana citoplasmática do fungo, alterando sua permeabilidade (KINSKY, 1970; MEDOFF; KOBAYASHI; KWAN; SCHLESSINGER; VENKOV, 1972; KWAN et al., 1972). Ao se ligarem aos esteróis,

em particular o ergosterol, principal esteroide da membrana celular dos fungos, estes agentes antifúngicos produzem poros ou canais, que aumentam a permeabilidade da membrana, gerando uma grande perda de eletrólitos, especialmente potássio, determinando assim a lise e morte celular (VANDEN et al., 1994; VANDEN, 1997; ROCHA & SIDRIM, 1999). A anfotericina B é considerada o tratamento de escolha para criptococose e atua como um importante imunomodulador que pode aumentar a função de macrófagos (WHITE ; ARMSTRONG, 1994; CLEMONS; STEVENS, 1998; STEVENS et al., 1998), sendo o antifúngico mais usado no tratamento das micoses primárias sistêmicas e oportunistas e o único grupo disponível sob a forma parenteral, podendo ser administrado associado a outros agentes terapêuticos. A via intravenosa é normalmente utilizada, no entanto, em determinadas situações com comprometimento do sistema nervoso central, nos casos de criptococose, paracoccidiodomicose e coccidiodomicose, recomenda-se via intratecal. Este antifúngico é considerado tóxico, sendo responsável por numerosos efeitos colaterais imediatos ou tardios como febre, calafrios dores musculares e articulares, náuseas e vômitos e como consequência do efeito acumulativo, a elevação da uréia e creatinina sérica, diminuição do potássio, anemia, além de irritação do endotélio venoso, podendo provocar tromboflebite no local da injeção da droga (LACAZ et al., 1993).

Poucos relatos têm sido descritos na literatura sobre a resistência aos poliênicos. Mutantes de *Candida albicans*, *C. neoformans* e *Aspergillus nidulans* resistentes a este grupo de agentes antifúngicos já foram obtidos em laboratório. Esta resistência foi explicada pelo decréscimo de conteúdo do ergosterol que poderia levar a uma diminuição da sensibilidade a anfotericina B (VANDEN et al., 1997).

Os derivados azólicos, devido a seu elevado efeito antifúngico e baixa toxicidade, desempenham importante papel na terapia das micoses superficiais e

sistêmicas. O primeiro azólico introduzido no mercado foi o micozanol em 1970 (DERESINSKI; LILLY; LEVINE; GALGIANI; STEVENS, 1977; GRAYBILL; MITCHELL; LEVINE, 1978; SUNG et al., 1978). Esse imidazólico quando introduzido por via intravenosa mostrou-se eficaz em alguns casos que não respondiam satisfatoriamente ao tratamento com outros antifúngicos, como a anfotericina B (LACAZ; DEL NEGRO, 1994). Todavia, o miconazol demonstrou elevada toxicidade e seu papel terapêutico tornou-se limitado quando usado por via intravenosa (SAAG et al., 2000). O cetoconazol, outro derivado imidazólico, passou a integrar o conjunto de antifúngicos de amplo espectro em 1981, utilizado por via oral no tratamento de micoses superficiais e sistêmicas. Embora seja amplamente ligado às proteínas plasmáticas, o cetoconazol tem uma distribuição bem limitada no organismo, não atingindo o líquido cefalorraquidiano (LACAZ; DEL NEGRO, 1994). No hospedeiro, o cetoconazol interfere na síntese de esteróides androgênicos e adrenais, produz distúrbios gastrintestinais como náuseas e vômitos e apresenta elevado potencial tóxico quando ingerido em altas dosagens, tendo seu uso limitado (TERREL, 1999).

Os triazólicos como o fluconazol de administração oral e venosa, e o itraconazol, ministrado por via oral, lançados no mercado em 1990 e 1992, respectivamente, têm-se mostrado como importantes opções terapêuticas contra uma série de infecções fúngicas. Estes antifúngicos apresentam vantagens, quanto à facilidade de administração oral e menor potencial de toxicidade do que o cetoconazol e a anfotericina B (HOESLEY; DISMUKES, 1997; KAUFFMAN; CARVER, 1997; TERREL, 1999). Estes triazólicos também não possuem nenhuma atividade sobre o sistema endócrino e apresentam elevada solubilidade na água, além de extensa distribuição pelos tecidos e fluídos orgânicos como urina, escarro, saliva e líquido cérebro espinhal. Além disto, apresentam boa absorção por via oral, tem afinidade com proteínas plasmáticas e

encontra-se em níveis elevados nos tecidos orgânicos ricos em lipídeos (PERFECT; DURAK, 1986; BRAMMER et al., 1990; TERREL, 1999). A terapia com fluconazol tem se mostrado mais eficaz e com melhor resposta clínica, quando os testes de susceptibilidade *in vitro* com os isolados de *C. neoformans* apresentam concentração inibitória mínima (CIM) menor que 16 µg/mL (PFALLER et al., 2004). Sabe-se também que isolados clínicos são menos susceptíveis ao fluconazol do que isolados ambientais (ALVES et al., 2001). O tratamento de pacientes com SIDA e meningite por *C. neoformans* var. *gattii* com fluconazol apresenta uma resposta clínica pobre e os teste de susceptibilidade *in vitro* para esta variedade mostram, geralmente, CIMs elevados para o fluconazol, sugerindo resistência (PEETERMANS; BOBBAERS; VERHAEGEN; VANDEPITTE, 1993).

Uma das diferenças observadas entre as variedades de *C. neoformans* é a dificuldade de se obter uma resposta terapêutica adequada em pacientes com infecção pelo *C. neoformans* var. *gattii* (DE BEDOUT et al., 1999), sendo que as infecções causadas por esta variedade requerem tratamentos mais longos do que os causados pelo *C. neoformans* var. *neoformans* (SPEED; DUNT, 1995) Além disto, a ocorrência de hibridização tem conseqüências na reprodutividade biológica de espécies de *C. neoformans*, com o aparecimento de novos genótipos com alteração da virulência ou susceptibilidade para drogas antifúngicas, que podem surgir através de trocas de material genético (BOEKHOUT et al., 2001).

### **Resposta Imune ao *C. neoformans***

Em diversas doenças, o conhecimento da imunorregulação exercida por citocinas tem facilitado o entendimento da patogênese e dos mecanismos protetores desenvolvidos pelo hospedeiro. Muitas citocinas têm grande potencial terapêutico ou como adjuvante

em vacinas, prevenindo a infecção ou, pelo menos, retardando o desenvolvimento de formas clínicas mais graves (KULLBERG et al., 1992).

Mosmann et al (1986), a partir de estudos de clones de células T CD4<sup>+</sup> de camundongos, mostrou a existência de duas subpopulações diferentes de células T que foram divididas em grupos conforme a função e padrões diferenciais de produção de citocinas. A subpopulação que produzia IL-2, IFN $\gamma$  e linfotóxina foi denominada Th1, enquanto a subpopulação que produzia IL-4 e IL-10 foi designada como Th2. Posteriormente um terceiro grupo foi identificado, o Th0, com capacidade de produzir citocinas de ambos os tipos e considerado como provável precursor das subpopulações Th1 e Th2 (FIRESTEIN et al., 1989; MOSMANN; MOORE, 1991; VELLA; PEARCE, 1992). Além disto, Letterio; Roberts, (1998) conceituaram um outro subgrupo de linfócitos T denominado Th3, o qual produz TGF- $\beta$ , mas não IL-4. As citocinas produzidas por células Th1 e Th2 podem regular-se mutuamente, sendo exemplo disto o IFN $\gamma$ , produzido por células Th1, que inibe a proliferação de células Th2 e a produção de IL-10, enquanto que as citocinas Th2 são capazes de inibir a síntese de citocinas produzidas por células Th1 (FERNANDEZ-BOTRAN et al., 1988; GAJEWSKI; FITCH, 1998; FIORENTINO et al., 1991; MOSMANN; MOORE, 1991).

A imunidade celular é decisiva na defesa dos pacientes contra a infecção pelo *C. neoformans*. O pulmão é a porta de entrada para este patógeno, sendo os macrófagos alveolares um dos tipos celulares capazes de inibir e matar o fungo (DIAMOND; BENNETT, 1972; REARDON, et al., 1996). A imunidade celular contra patógenos intracelulares requer a presença de interferon gama (IFN $\gamma$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), IL-2, IL-12 e ausência de IL-4 e IL-10 (MOSMANN; COFFMAN 1989; (ALMEIDA; ANDRADE; BENTO, 2001; MARIANO; MONTEIRO; ALEXANDRE; VES MELO, 2003; SHAO et al., 2005). Alterações nas células T e também nas células

dendríticas têm sido identificadas como um fator predisponente para as formas mais graves da criptococose, com rápida progressão e disseminação (ALMEIDA; ANDRADE; BENTO, 2001; BUENTKE; SCHEYNIUS, 2003; VECCHIARELLI et al., 2003).

Em paciente com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) há uma queda progressiva da imunidade celular em consequência da diminuição ou alteração do funcionamento de linfócitos T, o que leva a disfunção do sistema linfocítico-fagocitário, favorecendo o aparecimento de infecções fúngicas oportunistas (BACHIESI et al., 1994; MITCHELL; PERFECT, 1995; PERFECT; COX; DODGE; SCHELL, 1996; HERNÁNDEZ et al., 1998). A incapacidade de monócitos de indivíduos com SIDA em internalizar o *C. neoformans*, é a provável causa da progressão da criptococose nestes indivíduos (MONARI et al., 1997). O vírus da imunodeficiência humana determina múltiplos efeitos na resposta imune ao *C. neoformans* como a desregulação da produção de citocinas, queda na resposta Th1, queda da atividade anti-*Cryptococcus* de monócitos e macrófagos alveolares com redução na produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e aumento da multiplicação viral nos monócitos infectados (HARRISON; NONG; LEVITZ, 1997; PIETRELLA et al., 1999; LUTZ; CLEMONS; STEVENS, 2000; PIETRELLA; PERITO; BISTONI; VECCHIARELLI, 2001; PIETRELLA; LUPO; BISTONI ; VECCHIARELLI, 2004;)

A habilidade do *C. neoformans* para causar doença depende da combinação do crescimento intra e extracelular. Cinco estágios diferentes têm sido sugeridos para a infecção pelo *C. neoformans*: a iniciação, a dormência, a reativação, a proliferação e a disseminação (CASADEVALL et al., 1998; Del POETA, 2004) Durante o início do processo de infecção, células T produzem citocinas ativadoras de macrófagos com formação de granuloma, e destruição do fungo intracelular ou contido no estado de

dormência (FELDMESSER; KRESS; CASADEVALL, 2001). Nos indivíduos com imunidade celular debilitada, o *C. neoformans* cresce intracelularmente, podendo lisar o macrófago (reativação da disseminação) com a liberação do microrganismo que pode então infectar outros fagócitos, aumentando o crescimento de fungo (proliferação). Por outro lado o *C. neoformans* também é capaz de crescer extracelularmente, escapando da fagocitose através da produção de fatores específicos que bloqueiam a sua adesão e internalização pela célula fagocítica, incapacitando o reconhecimento e o desenvolvimento da resposta pelo sistema imune do hospedeiro (Del POETA, 2004). Desta forma, o *C. neoformans* é capaz de sobreviver e replicar-se intra e extracelularmente, aumentando a dinâmica de contato com todos os braços do sistema imune do hospedeiro.

A cápsula do *Cryptococcus* tem sido reconhecida como o mais importante fator de virulência deste microrganismo (FROMTLING; SHADOMY; JACOBSON, 1982; KWON-CHUNG; RHODES, 1986; JANBON, 2004) Os antígenos polissacarídeos da cápsula (GXM) afetam diversos parâmetros da resposta imune capazes de promover a persistência do fungo no interior do hospedeiro. Os principais aspectos afetados são as funções de macrófagos (aumento na expressão de ligante de FAS, inibição da fagocitose e da apresentação de antígenos), de células T (modulação da secreção de citocinas e aumento da replicação do HIV) e interferência com a migração leucocitária (KOZEL; GOTSchLICH, 1982; WALENKAMP et al., 2003; ELLERBROEK et al., 2004). Além disto, a cápsula do *C. neoformans* inibe a fagocitose por macrófagos, células dendríticas e neutrófilos e também inibe a internalização do fungo por células endoteliais (Del POETA, 2004). Os polissacarídeos da cápsula são capazes de reduzir a adesão e migração de leucócitos através do endotélio devido à sua habilidade de induzir a desensibilização cruzada de receptores de quimiocinas e aumentar a secreção de L-

selectinas da superfície dos leucócitos. O GXM de *Cryptococcus neoformans* também afeta a produção de interleucinas por leucócitos, induzindo a um aumento na produção de IL-10 e a perda de receptor de TNF da superfície de neutrófilos (ELLERBROEK; WALENKAMP; HOPELMAN; COENJAERTS, 2004). Amostras de *C. neoformans* acapsulares não são patogênicos, por outro lado, embora outras espécies de *Cryptococcus* produzam uma cápsula similar, eles também não são patogênicos. Isto sugere que a cápsula é necessária, mas não suficiente para as células de fungo causarem a doença, e que a habilidade de provocar infecção é aumentada por outros fatores de virulência. Esta hipótese é sustentada por achados mostrando que durante a criptococose humana, amostras de *C. neoformans* acapsulares ou pobres em cápsulas podem ser isoladas (KIMURA et al., 1997).

Embora 90% da cápsula do *C. neoformans* seja constituída de antígenos polissacarídeos, também foram descritas outras moléculas como as manoproteínas, capazes de alterar a resposta imune do hospedeiro. Ao contrário dos efeitos anti-inflamatórios descritos para os GXM, as manoproteínas parecem induzir macrófagos humanos a secretar IL-12 e desta forma podem favorecer ao desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1 (PIETRELLA; KOZEL; MONARI; BISTONI; VECCHIARELLI, 2001; PIETRELLA et al., 2002). O *C. neoformans* encapsulado promove a secreção de IL-10 por monócitos humanos, e em contraste, este parece suprimir a secreção de IL-12. Este fenômeno pode estar associado com a habilidade de *C. neoformans* encapsulado de suprimir a resposta Th1, pela supressão de IL-12, conseqüentemente, inibindo a produção de IFN $\gamma$  (RETINI et al., 2001). O mecanismo de defesa do hospedeiro contra o *C. neoformans* em infecção do SNC aparentemente é similar ao dos pulmões; via resposta Th1 mediada por célula efectoras (HUFFNAGLE; MCNEIL, 1999). O papel da resposta Th1 também é reforçado por estudos mostrando que pacientes que

sobreviveram a neurocriptococose apresentam níveis mais elevados de IL-6, IFN- $\gamma$  e IL-8 no líquido céfalo-raquidiano (LCR) do que os pacientes que vieram a óbito (SIDDIQUI; ZAMANI; PARADA, 2005). Além disto, a interação do *C. neoformans* com as células NK inibe a produção de citocinas como o fator de estimulação de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) e fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) (MURPHY; ZHOU; WONG, 1997; BLACKSTOCK; MURPHY, 2004).

Em modelos experimentais existe uma baixa produção de TNF- $\alpha$  após a infecção pelo *C. neoformans*, o que poderia explicar o aumento observado na produção de IL-4, IL-5, e IL-10 (HERRING et al., 2005). Animais deficientes na produção de IL-12 e IL-6 apresentam maior susceptibilidade à infecção por *C. neoformans*, em contraste com animais deficientes em IL-10, que são mais resistentes. Estes dados reforçam a hipótese de que as citocinas Th1 contribuem para a resistência natural contra a infecção pelo *C. neoformans* (HOAG; STREET; HUFFNAGLE; LIPSCOMB, 1995; NICHOLS; BAUMAN; SCHAFER; MURPHY, 2002; LUBERTO et al., 2003; CHEN et al., 2005; SUMMERS; DORLING; BOYLE; SHAUNAK, 2005; LINDELL; MOORE; MCDONALD; TOEWS; HUFFNAGLE, 2005). Todavia, a resposta mediada por anticorpos contra *C. neoformans* parece depender das associações entre citocinas Th1 e Th2 (BEENHOUWER; SHAPIRO; FELDMESSER; CASADEVALL; SCHARFF, 2001).

Um ponto alto das reações inflamatórias é o recrutamento e a ativação de leucócitos. Grande parte deste processo é coordenado pela produção de quimiocinas, que são citocinas com propriedades quimiotáticas, capazes de atrair seletivamente subpopulações celulares específicas para o local de infecção. Diversas quimiocinas, com a função de determinação de gradientes de quimioatração foram caracterizadas e seus genes clonados (SCHIMID; WEISSMANN, 1987). Essas moléculas são constituintes de

uma superfamília crescente de pequenos peptídeos e proteínas estruturalmente relacionadas (variando de 6 a 14 kDa). Atualmente, somando-se à função de direcionamento de diferentes populações leucocitárias, está a atribuição de que as quimiocinas também participam na ativação e proliferação de células T e na geração de outras citocinas (KUNKEL et al., 1995; MURPHY, 1996; BANGGIOLINI et al., 1997).

Nas doenças infecciosas, as interações de microorganismos com as células de defesa do hospedeiro podem induzir diretamente a liberação de quimiocinas. Recentemente muitas informações relevantes têm sido apresentadas sobre o papel das quimiocinas em infecções causadas por vírus como HIV (COCCHI et al., 1995) e influenza (SPRENGER et al., 1996), espiroquetas como *Borrelia* (SPRENGER et al., 1997), além de bactérias e parasitas que provocam reações tipicamente granulomatosas como o *Mycobacterium tuberculosis* (RIEDEL & KAUFMANN, 1997), helmintos como o *S. mansoni* (LUKAKS et al., 1993, 1995; CHENSUE et al., 1996), e fungos como o *C. neoformans* (KAWAKAMI et al., 1999; HUANG; LEVITZ, 2000; OLSZEWSKI et al., 2000; GOLDMAN et al., 2001).

Estudos em modelo experimental identificaram algumas quimiocinas (MIP-1 $\alpha$ , MCP-1 e IP-10) em associação com as respostas imunológicas protetoras desenvolvidas contra o *C. neoformans* (KAWAKAMI et al., 1999; HUANG et al., 2000; OLSZEWSKI et al., 2000; GOLDMAN et al., 2001). Estudos de imunohistoquímica localizaram a expressão de MCP-1 em macrófagos alveolares e células epiteliais. A indução de MCP-1 que se segue à fagocitose foi observada para macrófagos alveolares em animais infectados e não infectados dependendo da interação de CD11b/c e CD18 com o *C. neoformans* (HE; CASADEVALL; LEE; GOLDMAN, 2003). A presença de MIP-1 $\alpha$  é crucial para a prevenção do desenvolvimento da pneumonia eosinofílica e da disseminação do *C. neoformans* para o cérebro em modelo animal (OLSZEWSKI et al.,

2001). Baixos níveis de quimiocinas (MCP-1, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e IP-10) foram observados em animais infectados com cepas de *C. neoformans* que apresentavam alto grau de virulência (KAWAKAMI et al., 1999). Além disto, a microglia humana produz MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  em resposta à infecção pelo *C. neoformans* sendo um importante mecanismo de defesa, mas que pode ser inibido pelos polissacarídeos presentes na cápsula do fungo (GOLDMAN et al., 2001). Os GXMs da cápsula do *C. neoformans* são capazes de estimular a produção de IL-8 por células da micróglia e esta produção é parcialmente dependente da presença de proteínas do sistema de complemento (LIPOVSKY et al., 1998). O LCR de pacientes que sobreviveram à criptococose apresenta níveis aumentados de IL-8 embora seja interessante notar que existe ausência de leucocitose no LCR apesar da presença de IL-8 (CHAKA et al., 1997; SIDDIQUI et al., 2005) Todos estes dados descritos na literatura apontam para um possível papel protetor de algumas quimiocinas, em particular a MIP-1 $\alpha$ , na defesa do hospedeiro contra a infecção pelo *C. neoformans*.

A atividade anti-*Cryptococcus* exercida pelas células do sistema imune também parece ser dependente de outros mediadores solúveis além das citocinas e quimiocinas. A produção de óxido-nítrico (NO) e de espécies reativas de oxigênio (ERO) por leucócitos humanos apresenta um papel importante na defesa contra diversas infecções (FANG, 2004).

O NO é um radical livre ubíquo gasoso, produzido por uma grande variedade de células através das ações sintetizadoras de uma família de enzimas coletivamente denominadas de óxido nítrico sintases (NOS) (HIBBS et al., 1987; NATHAN, 1994; FERRINI et al., 2001). Essas enzimas deaminam a L-arginina para liberar NO, havendo co-produção de L-citrulina (NATHAN, 1997). Tem-se descrito três isoformas da NOS que são codificadas por genes separados e que requerem induções distintas. Uma é a

forma encontrada nas células neuronais (nNOS, NOS-1), a segunda nas células endoteliais (eNOS, NOS-3), sendo que estas duas formas produzem constitutivamente baixas quantidades de NO que agem em processos fisiológicos incluindo a neurotransmissão e a vasodilatação (PALMER et al., 1998; MONCADA et al., 1991; LYONS et al., 1995). A terceira isoforma é a NOS induzível (iNOS, NOS-2), que pode ser encontrada em quase todos os tipos celulares após estimulação (FORSTERMANN et al., 1995). Os principais estimuladores das NOS que levam a uma produção acentuada de NO são as citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ , e/ou produtos microbianos (LPS) (XIE et al., 1992; NATHAN, 1997).

Sendo uma molécula instável (vida média de 3-10 segundos), o NO reage rapidamente com o oxigênio formando NO<sub>2</sub> (dióxido de nitrogênio) originando em seguida NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (nitrito) e NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (nitrato). Além disso, combina-se com a hemoglobina, sabidamente um consumidor natural de NO, para formar metahemoglobina. (KEILIN; HARTRE, 1937).

Trabalhos experimentais com camundongos Knock-out para a enzima sintase do óxido nítrico induzível (NOS2<sup>-/-</sup>) mostram um maior número de células fúngicas no pulmão destes animais após a infecção com *C. neoformans* se comparados aos camundongos normais (RIVERA; MUKHERJEE; WEISS; CASADEVALL, 2002). Além disto, a utilização de inibidores da NOS2 (L-NMMA) reduz a capacidade citotóxica de leucócitos estimulada por IFN- $\gamma$  contra o *C. neoformans* (TOHYAMA; KAWAKAMI; FUTENMA; SAITO, 1996). De uma forma geral, os trabalhos da literatura mostram que o desenvolvimento de uma resposta protetora na criptococose, com a morte das células fúngicas, parece estar ligado à produção de IFN- $\gamma$  e NO (GOLDMAN; CASADEVALL; CHO; LEE, 1996; TOHYAMA; KAWAKAMI; SAITO, 1996; ROSSI et al., 1999; NICHOLS; BAUMAN; SCHAFFER ; MURPHY,

2002; RIVERA; MUKHERJEE; WEISS; CASADEVALL, 2002). Além disto, as interações e o balanço entre as espécies reativas de nitrogênio (RNS) e as espécies reativas de oxigênio (ERO) é extremamente importante, visto que altos níveis de RNS e ERO podem levar à formação de altas concentrações de peroxinitrito, responsável por vários efeitos citotóxicos do NO e também capaz de causar lesão tecidual no hospedeiro (FANG, 2004)

Com relação à produção de espécies reativas de oxigênio existem muito poucos trabalhos na criptococose. A produção de radicais livres de oxigênio e emissão de quimioluminescência por granulócitos durante a fagocitose de partículas opsonizadas foi originalmente descrita por (ALLEN et al., 1972) Este fenômeno está provavelmente associado à ativação metabólica da via das hexoses monofosfato (ALLEN et al., 1972; STJERNHOLM; MANAK, 1970), a produção de espécies reativas de oxigênio ( $O_2^{\cdot -}$ ,  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot -}$ , OH) (ALLEN et al, 1972 ; BABIOR et al, 1973; KRINSKY, 1974 ; KLEBANOFF, 1975 ; TAUBER & BABIOR, 1977) e a oxidação da partícula que está sendo englobada (KLEBANOFF, 1967). A quimioluminescência celular produzida por granulócitos ativados pode estar alterada em processos inflamatórios, infecções, doenças crônicas, neoplasias, e no envelhecimento (HIRANO; MATSUI, 1986; PATERHANS, 1986; SHAN, 1986; Van DYKE; Van DYKE, 1986; CHAVES et al., 1998; NOGUEIRA-MACHADO et al., 2003). A produção de espécies reativas de oxigênio por granulócitos ativados é um processo bastante complexo onde várias etapas estão envolvidas. A interação do receptor localizado na membrana plasmática do granulócito (CR3) com o fragmento C3b do sistema de complemento na superfície de uma partícula opsonizada é capaz de induzir a transdução de sinais para o meio intracelular. Neste processo estão envolvidas inúmeras reações bioquímicas capazes de, em última instância, gerar espécies reativas de oxigênio (FOLLIN; DAHLGREN,

1992). Sabe-se que algumas espécies reativas de oxigênio como o radical OH<sup>•</sup> e o HOCl são moléculas efetoras contra o *C. neoformans* (ROSSI; SASTRE; RUBINSTEIN; MASI, 1994; CHATURVEDI; WONG; NEWMAN, 1996) e que o manitol produzido pelo fungo é uma molécula importante para enfrentar o ataque oxidativo dos fagócitos do hospedeiro (CHATURVEDI; WONG; NEWMAN, 1996). Além deste mecanismo de escape do ataque oxidativo o fungo também é capaz de produzir melanina que pode atuar como anti-oxidante, protegendo às células fúngicas do ataque de fagócitos (WANG; AISEN; CASADEVALL, 1995; MEDNICK; NOSANCHUK; CASADEVALL, 2005).

A gravidade da doença e o prognóstico na criptococose são dependentes, em grande parte, da integridade do sistema imune do hospedeiro e das características próprias de cada variedade de *Cryptococcus neoformans*. (WORMLEY, JR. et al., 2005). Alguns estudos na criptococose experimental mostram diferenças de comportamento entre as variedades de *C. neoformans* no que se refere ao infiltrado neutrofílico, tempo de início de fagocitose e taxa de ligação do C3 aos componentes da cápsula, sugerindo que a variedade *gattii* parece ser mais difícil de ser fagocitada (WASHBURN; BRYANT-VARELA; JULIAN; BENNETT, 1991). Os infiltrados de PMNs em pulmões de camundongos infectados com *C. neoformans* var. *gattii* são menores quando comparados com infiltrados de PMNs em pulmões de camundongos infectados com *C. neoformans* var. *neoformans*, indicando uma relativa inadequação do mecanismo de resistência do hospedeiro para prevenir a infecção pelo *C. neoformans* var. *gattii*, em parte pela inibição da migração de PMNs para o local onde se encontra esta variedade (WRIGHT et al., 2002). O maior tamanho da cápsula de polissacarídeos do *C. neoformans* var. *gattii* também deve contribuir para uma menor ativação da via alternativa do sistema do complemento, levando a uma maior dificuldade de tratamento

da infecção causada por estes sorotipos (WASHBURN et al., 1991; YOUNG; KOZEL, 1993; DONG; MURPHY, 1995). Além disto, sobrenadantes de cultura da variedade *neoformans* apresentam atividade estimuladora da quimiotaxia de neutrófilos enquanto que os sobrenadantes da variedade *gattii* são inibidores desta mesma atividade (WASHBURN et al., 1991; WRIGHT et al., 2002). Estes autores lançaram a hipótese de que a inibição da quimiotaxia poderia causar uma ausência ou diminuição do infiltrado neutrofílico em resposta à infecção pela variedade *gatti*, resultando em um “clearance” pulmonar reduzido deste patógeno o que poderia, por sua vez, favorecer ao aparecimento de granulomas.

As diferenças no comportamento das variedades de *C. neoformans* ainda são muito pouco compreendidas e os trabalhos enfocam principalmente a criptococose experimental. A resposta imune à variedade *gattii* é muito pouco conhecida e a maioria dos trabalhos existentes restringe-se apenas ao estudo isolado da espécie *C. neoformans*. Existe, portanto, uma lacuna de conhecimento associado ao estudo comparativo da resposta imune às variedades do *C. neoformans*.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a susceptibilidade a antifúngicos e a resposta imune *in vitro* de leucócitos humanos frente às variedades de *C. neoformans*.

**Objetivos**

### **Objetivo Geral:**

Avaliar a susceptibilidade à antifúngicos de variedades de *C. neoformans* isoladas de pacientes com criptococose atendidos no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e a resposta imune *in vitro* frente às variedades *gattii* e *neoformans*.

### **Objetivos Específicos**

- 1- Identificar as variedades de *C. neoformans* que causam criptococose em pacientes do Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro;
- 2- Determinar o perfil de sensibilidade das variedades de *C. neoformans* isoladas no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro aos derivados azólicos como itraconazol, cetoconazol, e fluconazol e ao poliênico anfotericina B através das técnicas de microdiluição em caldo;
- 3- Avaliar comparativamente a produção de citocinas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10) por leucócitos e células mononucleares do sangue periférico de voluntários saudáveis após a estimulação “*in vitro*” com *C. neoformans* var *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii*.
- 4- Avaliar comparativamente a produção de óxido-nitrico (NO) por leucócitos e células mononucleares do sangue periférico de indivíduos normais após a estimulação “*in vitro*” com *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii*.
- 5- Avaliar comparativamente a produção de radicais livres de oxigênio (ERO) por granulócitos do sangue periférico de indivíduos normais após a estimulação “*in vitro*” com *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii*.

**Justificativa**

Existem muitas diferenças não compreendidas entre as variedades de *C. neoformans*. Importantes estudos epidemiológicos têm demonstrado diferenças geográficas na distribuição das variedades e existem relatos de maior dificuldade no tratamento com antifúngicos nas infecções por *C. neoformans* variedade *gattii*.

Do ponto de vista imunológico a maioria dos trabalhos existentes não enfoca comparativamente a resposta imune às variedades, restringindo-se ao estudo da espécie *C. neoformans*. Existe, portanto uma lacuna de conhecimento associado ao estudo das variedades deste patógeno e em especial à variedade *gattii*.

Através do estudo da susceptibilidade das variedades de *C. neoformans* aos antifúngicos, saberemos quais podem ser mais eficazes para o tratamento de cada variedade a partir da determinação da concentração inibitória mínima necessária para inibir o crescimento do fungo *in vitro*.

A identificação do perfil de mediadores (citocinas, óxido-nítrico e espécies reativas de oxigênio) produzidos após a estimulação *in vitro* com cada variedade poderá ampliar os conhecimentos sobre os mecanismos da resposta imunológica e possibilitar o estabelecimento de estratégias futuras no tratamento da criptococose nos pacientes acometidos.

**Hipótese**

Variedades de *C. neoformans* podem apresentar diferentes susceptibilidades à antifúngicos e induzir respostas imunológicas distintas.

## **Material e Métodos**

## **Amostras biológicas de paciente com criptococose**

As amostras biológicas (líquido cefalorraquidiano - LCR, raspado de lesão, lavado brônquio-alveolar e sangue) previamente utilizadas para fins de diagnóstico, foram cedidas pelo Serviço de Patologia Clínica da UFTM. Após ser identificada a presença de fungo encapsulado nestas amostras, os mesmos foram isolados por cultivo em ágar Sabouraud dextrose (DIFCO-USA).

Foram isoladas 33 amostras no período de dezembro de 2001 a julho de 2005 e identificadas comprovadamente como positivas para *Cryptococcus neoformans* e suas variedades. Os dados epidemiológicos como idade, sexo, procedência e sorologia para HIV, foram obtidos no SAME (Serviço de Arquivo Médico) da UFTM e organizados em bancos de dados.

### **Identificação e isolamento das variedades de *Cryptococcus neoformans***

Após identificação microscópica pelo exame direto para fungo encapsulado corado por tinta da nanquim (figura 1), as amostras foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose (DIFCO-USA), em estufa a 28°C (para melhor crescimento de fungos filamentosos) e 36°C (para melhor crescimento de fungos leveduriformes). Colônias sugestivas de *C. neoformans* (figura 2) eram repicadas em meio ágar niger, meio de Christensen, para avaliar respectivamente a atividade de fenoxidase e urease (figura 3). O teste de assimilação de açúcar inositol também foi realizado. Quando os resultados de todas estas provas eram positivos identificava-se a espécie *Cryptococcus neoformans*. (CHRISTENSEN et al., 1946, STAIB et al., 1987; LACAZ, 2002). As variedades foram determinadas com base nas características de reação das cores no meio L-canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB). As amostras de *C. neoformans* foram crescidas em tubos contendo ágar Sabouraud dextrose (DIFCO-USA), a 36°C por 48 horas. Após este período era feito o repique em tubos contendo meio CGB e incubados

novamente por 48 horas a 36°C. Quando o meio mudava da cor amarela para azul cobalto (figura 4), os isolados eram identificados como variedade *gattii* e os que não mudavam a cor do meio ou mudavam para verde foram identificados como variedade *neoformans* (KWON-CHUNG; POLACHECK; BENNETT, 1982).

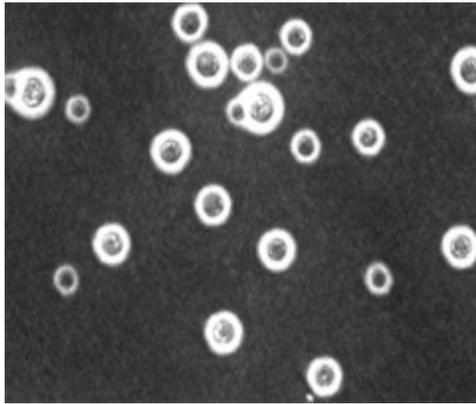
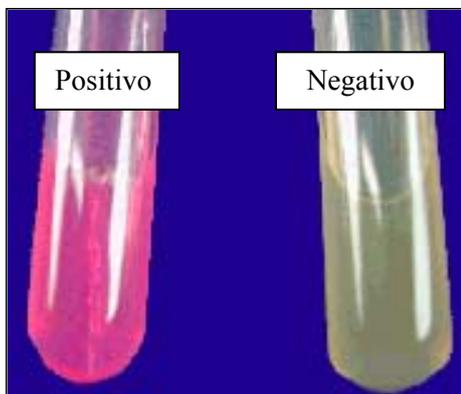


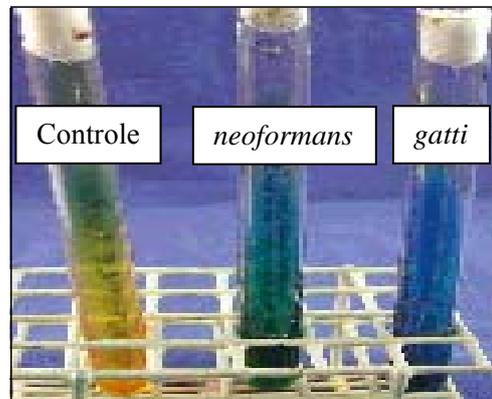
Figura 1: Pesquisa direta pela tinta nanquim para fungo encapsulado.



Figura 2: Cultivo de *C. neoformans* em àgar Sabouraud



Figuras 3: Meios de cultura utilizados para: identificação de *C. neoformans*. Teste de produção urease. A coloração rósea caracteriza a positividade do teste.



Figuras 4: Identificação por L-CGB (canavanina-glicina-bromotimol). A coloração azul-cobalto identifica *C. neoformans* variedade *gatti*. Enquanto a coloração verde identifica *C. neoformans* variedade *neoformans*.

Fonte: Disciplina de Microbiologia - UFTM

### Teste de susceptibilidade a antifúngicos

Foi realizado o teste de microdiluição em caldo utilizando método proposto pelo CLSI (“Clinical and Laboratory Standards Institute”), antigo NCCLS (“National Committee for Clinical Laboratory Standards”) segundo protocolo M-27–A2 (NCCLS, 2002) para quantificar a concentração inibitória mínima (CIM), visando avaliar o perfil de susceptibilidade das variedades de *C. neoformans* isoladas neste estudo.

### **Cultivo e preparo do inóculo das variedades de *Cryptococcus neoformans***

Amostras de cada variedade de *C. neoformans* foram cultivadas em placas de Petri estéreis com ágar Sabouraud dextrose (DIFCO-USA), em estufa bacteriológica a 36°C por 48 horas. Para o preparo do inóculo coletava-se cinco colônias de 1 mm de diâmetro e ressuspendeu-se em tubos com 10ml de salina estéril. Em seguida, através da adição de solução salina ou amostras do fungo, a turvação da amostra era ajustada para 85% de transmitância (0,5 da escala de Mac Farland) por espectrofotometria em comprimento de onda de 530 nm (MICRONAL Mod. B 582), o que correspondia, aproximadamente, a  $1,0 \times 10^6$  células/mL (BIER, 1980).

Posteriormente esta suspensão era diluída em solução salina estéril (1:50), e em seguida diluída (1:20) em meio de cultura RPMI 1640 com L-glutamina sem bicarbonato (INLAB-BRASIL) para obter-se uma concentração entre 500 a 2500 céls/mL que corresponde ao inóculo utilizado em cada experimento.

### **Preparo e diluições dos agentes antifúngicos**

Foram preparadas soluções estoque (3200 µg/mL) de anfotericina B (CRISTÁLIA-BRASIL), cetoconazol (GENIX-ÍNDIA), e itraconazol (GENIX-ÍNDIA) em dimetil-sulfóxido, DMSO (SIGMA-USA) e homogeneizada em vórtex. A solução estoque era então diluída 100 vezes em RPMI 1640 contendo L-glutamina e sem

bicarbonato (INLAB-BRASIL) obtendo-se uma solução de uso com concentração de 32µg/mL.

Para o fluconazol (GENIX-ÍNDIA) foi preparada uma solução estoque (1280 µg/mL) em água destilada estéril homogeneizada em vórtex. A solução estoque era então diluída 10 vezes em RPMI 1640 contendo L-glutamina e sem bicarbonato (INLAB-BRASIL) obtendo-se uma solução de uso com concentração de 128 µg/mL.

O teste de susceptibilidade foi realizado em placas de microtitulação estéreis (DIFCO). No primeiro poço de cada fileira horizontal da placa, foi colocado 200 µL da solução de antifúngico (cetoconazol, itraconazol e anfotericina B com concentração de 32 µg/ml.). Com relação ao fluconazol, colocou-se no primeiro poço de cada fileira, 200 µL da solução (com concentração de 128 µg/mL), do segundo ao décimo poço colocou-se 100 µl de meio de cultura RPMI, no décimo primeiro poço colocou-se 100 µl de antifúngico e 100 µl de meio de cultura RPMI, (controle negativo) e no décimo segundo poço colocou-se 100 µl de meio RPMI e 100 µl de inóculo de cada variedade de fungo (controle positivo).

Posteriormente realizou-se uma diluição seriada com volume de 100 µl, indo do 1º poço até o 10º poço, desprezando-se no final um volume de 100 µl da solução de diluição. Em seguida colocou-se 100 µl de inóculo do fungo já preparado do primeiro ao décimo poço, e incubaram-se as placas tampadas a 36°C por 72 horas em estufa bacteriológica. Após esta etapa era realizada a leitura macroscópica da placa sendo a CIM determinada como o poço com crescimento menor que 50% do crescimento do poço controle (figura 05). O mesmo procedimento foi realizado com uma cepa controle de *Candida parapsilosi*, (ATCC 22019) com CIMs pré-conhecidas para cada experimento realizado, para a validação dos resultados obtidos nas amostras. Para cada fileira de 12 poços da placa foi testada uma amostra de fungo e uma de antifúngico.

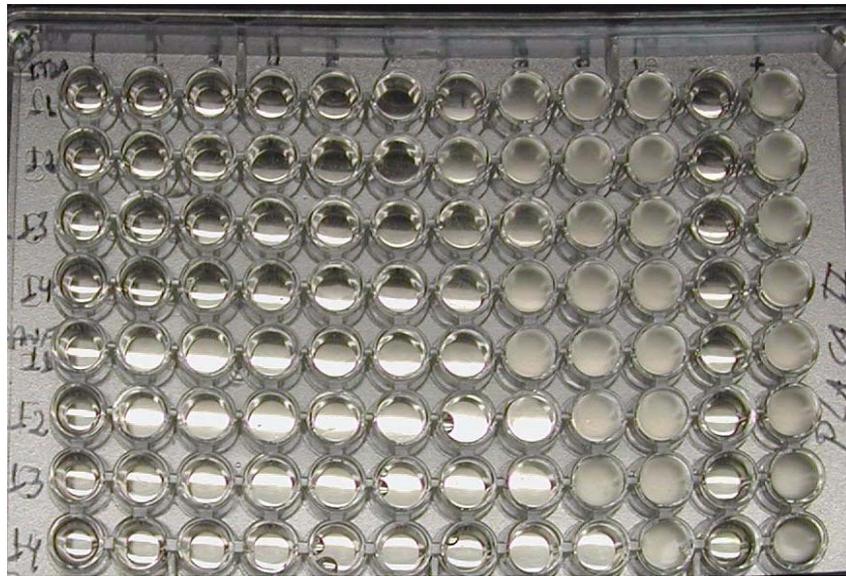


Figura 5. Placa de microtitulação com resultados de concentração inibitória mínima (CIM) para antifúngicos das amostras testadas. Fonte: Disciplina de Laboratório Clínico DCM-UFTM

### **Cultivo de amostras de *C. neoformans* para estimulação de leucócitos**

Foram utilizadas amostras de *Cryptococcus neoformans* variedade *neoformans* (sorotipo A CBS 132) e *Cryptococcus neoformans* variedade *gattii* (sorotipo B, ICB 565), cedidos gentilmente pela Prof. Orionalda de Fátima Lisboa Fernandes do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. As amostras foram cultivadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud com 1% de peptona (LACAZ, 2002), durante quatro dias. Em capela de fluxo laminar, foram coletadas cinco colônias de cada variedade de *C. neoformans* e ressuspensas em tubos de vidro com tampa de roscas estéreis contendo 5 mL de solução salina estéril, lavadas três vezes por centrifugação a 300 g por cinco minutos. Após a lavagem o sedimento foi resuspenso em 1 mL de solução salina estéril. Para contagem em câmara de Neubauer, a suspensão diluída 1:100 em solução salina estéril, ajustando-se a concentração para  $1,0 \times 10^7$  células de fungo encapsuladas por mL.

### **Obtenção de amostras de sangue periférico de indivíduos voluntários saudáveis.**

Para os ensaios de estimulação de leucócitos com as variedades de *Cryptococcus neoformans* foram utilizadas amostras de sangue venoso periférico (10,0 mL) coletadas com anticoagulante (heparina), de dez (10 doadores voluntários saudáveis maiores de 18 anos, pareados por sexo e idade).

### **Ensaio de estimulação de leucócitos em sangue total**

Em tubos de polipropileno eram pipetados 0,25 mL de sangue venoso periférico de doadores voluntários saudáveis, juntamente com 0,75 mL de solução salina estéril e 50 µl de suspensão de células de fungo encapsuladas ( $1,0 \times 10^7$  por mL). No tubo denominado de controle negativo foi adicionado 50 µl de solução salina estéril ao invés

da suspensão de células de fungo. A seguir, todos os tubos incubados por 18 horas em estufa a 37°C /5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, os tubos centrifugados a 224 g por 10 minutos e os sobrenadantes eram coletados e armazenados a -20 °C, para posterior dosagem das citocinas por ELISA.

### **Isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)**

O sangue venoso periférico (10ml) foi coletado de indivíduos voluntários saudáveis com heparina e cuidadosamente colocado sobre 5 mL de uma solução de ficoll-hypaque em tubos plásticos cônicos (FALCON) de 15 mL. Os tubos foram centrifugados a 384 g por 30 minutos a 4°C em centrífuga refrigerada. Ao final da centrifugação, obteve-se um anel de células mononucleares na interface entre a solução de ficoll e o plasma. O plasma foi retirado cuidadosamente e o anel de células coletado com o auxílio de uma pipeta Pasteur e transferido para um tubo cônico de 50,0 mL (FALCON). O excesso de ficoll foi removido por centrifugação lavando-se as células por 3 vezes com 30,0 ml de RPMI sem soro, a 4°C e 216 g por 10 minutos. As células foram ressuspensas em 5,0 ml de RPMI contendo 4,75 g/L de HEPES, 5% de soro fetal bovino inativado, 1% de L-glutamina e 40 µg/mL de gentamicina. A quantidade de células obtidas foi determinada por contagem em câmara de Neubauer e a viabilidade celular utilizando-se o teste do azul de tripan. Todos os procedimentos foram realizados em condições estéreis utilizando-se capela de fluxo laminar, com exceção da contagem de células.

### **Ensaio de estimulação com variedades de *Cryptococcus neoformans***

Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram estimuladas com células de fungo encapsuladas mortas pelo calor (60°C por 60 minutos) na proporção

1:10, ou seja,  $1,0 \times 10^6$  PBMC para  $1,0 \times 10^7$  células de fungo em placas de cultivo estéreis de 24 poços (BD/FALCON-USA). A seguir, as placas foram incubadas por 18 horas em estufa a  $37^\circ\text{C}/5\%$  de  $\text{CO}_2$ . Após a incubação os sobrenadantes eram centrifugados a 305 g por sete minutos, coletados e estocados a  $-20^\circ\text{C}$ , para posteriormente dosagem das citocinas por ELISA.

### **Produção de radicais livres de oxigênio (ERO) por granulócitos humanos**

O sangue periférico de doadores voluntários normais (10,0 mL) era coletado em tubo com heparina. Em tubos de vidro estéreis e siliconizados (15 mL), pipetou-se 3mL de solução de leucopaque (BION-BRASIL) com densidade 1,12 e lentamente sobre a solução anterior, 3mL de solução de monopaque (BION-BRASIL) de densidade 1,077. O sangue previamente coletado foi então adicionado vagarosamente sobre este gradiente duplo até um volume total 10 ml. Depois de centrifugado a 400 g por 30 minutos e  $22^\circ\text{C}$ , o plasma foi removido para outro tubo. O anel de células mononucleares e o anel de granulócitos foram transferidos separadamente para tubos siliconizados. Em seguida lavou-se a suspensão de granulócitos com 8 mL de tampão salina fosfato estéril (PBS) por 30 minutos a 250 g e  $22^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi retirado e acrescentou-se mais 8 ml de tampão PBS, lavando-se por 15 minutos a 250 g e  $22^\circ\text{C}$ . Após esta etapa, desprezou-se todo o sobrenadante e ressuspendeu-se os granulócitos em 1,0 ml de tampão PBS estéril. Para a contagem em câmara de Neubauer diluiu-se 1:100 com PBS a suspensão de granulócitos em tubos siliconizados acertando a concentração final para  $1,0 \times 10^6$  células por mL. Todos os procedimentos foram realizados em condições estéreis utilizando-se capela de fluxo laminar, com exceção da contagem de células.

As variedades de *Cryptococcus* e o zimosan (parede de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*) foram opsonizados com plasma do próprio doador, sendo 1,0

x  $10^7$  células lavadas com PBS por centrifugação a 250 g por 4 minutos e desprezados os sobrenadantes. Em seguida adicionou-se 0,2 mL de plasma autólogo e 0,8 mL de PBS estéril, homogeneizando-se com pipeta Pasteur a cada 10 minutos em banho maria  $37^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. Depois de centrifugados a 250 g por 4 minutos, retirou-se todo o sobrenadante e acrescentou-se 0,5 mL de tampão PBS estéril.

A detecção de radicais livres foi realizada segundo Chaves et al., (1998) em um luminômetro (Lumat LB 9501 Berthold, GERMANY) após adição de 0,5 mL de reagente luminescente (luminol) diluído 1:100 em PBS juntamente com 0,1 mL de suspensão de granulócitos ( $1,0 \times 10^6$  células por mL) em PBS estéril durante 10 minutos, medidos a cada minuto, em unidades relativas de luz por segundo (RLU/s). Após estes 10 minutos, adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  ( $1,0 \times 10^7$  céls/mL) de suspensão de variedades de *C. neoformans* mortos pelo calor (60 minutos em banho Maria à  $60^\circ\text{C}$ ) ou zimosan (controle de fagocitose) durante 40 minutos, medidos em RLU/s a cada minuto. Os resultados foram expressos em pico-máximo (em RLU/s) e/ou integral (área) da curva obtida com o auxílio do software Image J versão 1.32.

### **Fagocitose de variedades de *C. neoformans* por granulócitos humanos**

Pipetou-se 0,2 mL ( $1,0 \times 10^7$  por mL) de suspensões contendo variedades de *C. neoformans* mortas pelo calor e opsonizadas. Estas soluções eram coradas com 0,2 mL de azul de tripan a 1% por 15 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente, lavou-se a suspensão de células de fungo coradas com 3,0 mL de tampão PBS (5 minutos, 190 g por 2 vezes) e desprezou-se o sobrenadante. Adicionou-se então 0,2 mL de suspensão de granulócitos humanos ( $1,0 \times 10^6$  céls/mL), e incubou-se em banho maria a  $37^\circ\text{C}$  por 20 minutos. Para observação colocava-se 10  $\mu\text{l}$  em câmara de Neubauer. A fagocitose era então

observada em microscópio de luz trinocular (em aumento de 400x) contendo filmadora, placa de captura de vídeo e software para captura e análise de imagens.

### **ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”)**

As citocinas presentes nos sobrenadantes de cultura foram dosadas por ELISA utilizando citocinas recombinantes e pares de anticorpos monoclonais comercialmente disponíveis (BD/Pharmingem-USA para IL-10 e TNF- $\alpha$  e R&D-USA para o IFN- $\gamma$ ). Foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato (NUNC, USA), recobertas com anticorpos monoclonais específicos (concentração final de 1 $\mu$ g/mL) em tampão carbonato (pH = 9,4) e mantidas a 4°C por 18 horas. Após esta incubação as placas eram lavadas por quatro vezes com uma solução de PBS-Tween 20 (PBS-T) e bloqueadas com 200  $\mu$ l por poço de tampão PBS contendo 2% albumina bovina (SIGMA-USA) e incubadas por 4 horas à temperatura ambiente. Após mais esta incubação as placas eram lavadas por quatro vezes com uma solução de PBS-Tween 20 (PBS-T). Às colunas 11 e 12 de cada placa foi adicionado 100  $\mu$ l de citocina padrão recombinante, seguindo diluições seriadas 1:2 em PBS, contendo 5% de soro fetal bovino (FCS) a partir das concentrações iniciais. Às outras colunas foram adicionados 100  $\mu$ l/poço de sobrenadante de cultura a ser dosado. As placas foram incubadas a 37°C, por duas horas e lavadas por quatro vezes com uma solução de PBS-Tween 20 (PBS-T). A seguir, foram adicionadas 100  $\mu$ l/poço do anticorpo anti-citocina a ser dosada, marcada com biotina, diluída 1:1000 em PBS-T. As placas foram reincubadas por 2 horas, a temperatura ambiente e, novamente lavadas por 4 vezes em PBS-T. Após esta etapa, foram adicionadas 100  $\mu$ l/poço de streptoavidina marcada com fosfatase alcalina (PIERCE-USA), diluída 1:1000 em PBS-T. As placas foram incubada por 2 horas e lavadas por 4 vezes com PBS-T, quando então foi adicionado 100  $\mu$ l/poço do substrato p-nitrofenilfosfato - pNPP (SIGMA-USA). A leitura dos resultados em

densidade ótica (D.O.) foi obtida pela diferença entre as absorvâncias medidas a 405 e 490nm ( $Abs_{405} - Abs_{490}$ ), em um leitor automático de ELISA. A concentração de citocinas nos sobrenadantes foi determinada em pg/mL, pela comparação com as absorvâncias obtidas em uma curva padrão com a respectiva citocina recombinante realizada simultaneamente.

### **Dosagem de nitrito/nitrato:**

A concentração de nitrito/nitrato foi determinada pela reação de Griess, (GREEN et al., 1982), após redução enzimática de nitrato a nitrito com a enzima nitrato redutase em tampão de redução (para sobrenadantes de cultura de sangue total) ou sem a etapa de redução (quando os sobrenadantes eram obtidos de células mononucleares purificadas). A redução do nitrato nas amostras de plasma, obtido do sobrenadantes de cultura de sangue total, foi feita a 37°C por 18 horas. A detecção do nitrito foi realizada pela adição de 50µl de reagente de Griess (preparado pela mistura de volumes iguais de solução de sulfanilamida a 1% em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2,5% e solução de naftiletlenodiamida a 0,1% de em H<sub>2</sub>O) e incubando-se à temperatura ambiente por dez minutos. A absorvância foi medida a 540nm usando um leitor automático de microplacas. As concentrações de nitrito foram calculadas por extrapolação para uma curva padrão de NaNO<sub>2</sub> e os dados expressos em µmoles de nitrito/nitrato.

### **Condições livres de endotoxina**

Para se garantir condições livres de endotoxina, toda a vidraria utilizada no preparo de soluções e reagentes foi aquecida a 200°C e posteriormente autoclavada. Todas as soluções foram esterilizadas e filtradas (0,22µm). As ponteiras e todos os materiais utilizados foram mantidos em condições estéreis e livres de pirógenos.

## **Aspectos éticos**

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da UFTM (CEP-UFTM) com o número de protocolo CEP/FMTM: 472

## **Análise Estatística**

Os dados obtidos neste trabalho foram analisados pelo aplicativo Statview. Para os dados que apresentam dispersão gaussiana, foram utilizados testes e análise de variância (ANOVA) com repetição (amostra em triplicata) e testes Bonferroni para comparação do valor obtido de  $p$  com o valor esperado  $p < 0.05$ , e de Tuckey e Dunnet para dados não pareados com significância estabelecida em 5%. Testes não paramétricos foram aplicados para os dados onde a distribuição não era Gaussiana. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os diferentes grupos e o teste de Mann-Whitney para comparar diferenças entre dois grupos ( $p < 0,05$ ).

**Resultados**

Neste trabalho foram estudadas trinta e cinco amostras de *C. neoformans*. Com relação à origem, vinte e oito amostras (85%) foram isoladas do LCR, sendo vinte e sete identificadas como variedade *neoformans*, e uma como variedade *gattii*. A partir do sangue foram isoladas duas amostras (6%), todas identificadas como pertencentes à variedade *neoformans*. Duas amostras foram obtidas de lavado brônquico (6%), sendo uma da variedade *gattii* e outra da variedade *neoformans*, e uma amostra foi isolada de raspado de lesão de couro cabeludo (3%), identificada como variedade *gattii* (tabela I). Também foram incluídas no estudo duas amostras cedidas pela Universidade Federal de Goiás (UFGO), identificadas como CBS 132, (sorotipo A, variedade *neoformans*) e ICB 565 (sorotipo B, variedade *gattii*).

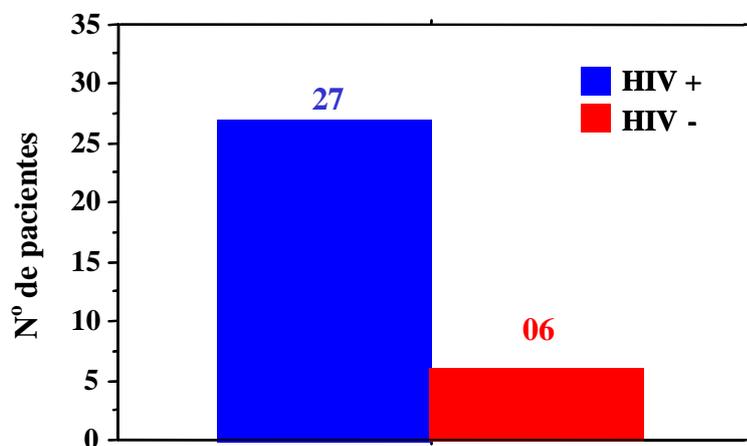
**Tabela I: Distribuição das amostras de *C. neoformans* quanto ao local de isolamento e variedades encontradas.**

Local de isolamento	Variedade <i>neoformans</i>	Porcentagem (%)	Variedade <i>gattii</i>	Porcentagem (%)	Total	Porcentagem (%)
LCR	27	90,0	01	33,3	28	84,8
Lavado brônquico	01	3,3	01	33,3	02	6,06
Sangue	02	6,7	00	0,0	02	6,06
Raspado de lesão	00	0,0	01	33,3	01	3,00
Total	30	100,0	03	100,0	33	100,0

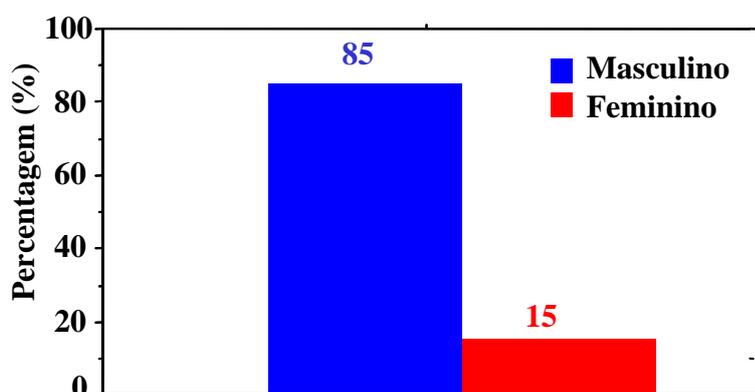
#### Epidemiologia dos *C. neoformans* isolados

Em relação à sorologia para HIV, das trinta e três amostras isoladas e identificadas como *C. neoformans* na UFTM no período de dezembro de 2001 a julho de 2005, vinte e sete (81,8%) foram de pacientes com sorologia positiva para HIV, e seis (18,2%) com sorologia negativa (figura 6). A maioria dos pacientes acometidos de criptococose foi do sexo masculino (85%) conforme apresentado na figura 7 e a faixa etária (figura 8) apresentou uma maior frequência entre trinta e um a quarenta anos (42,4%).

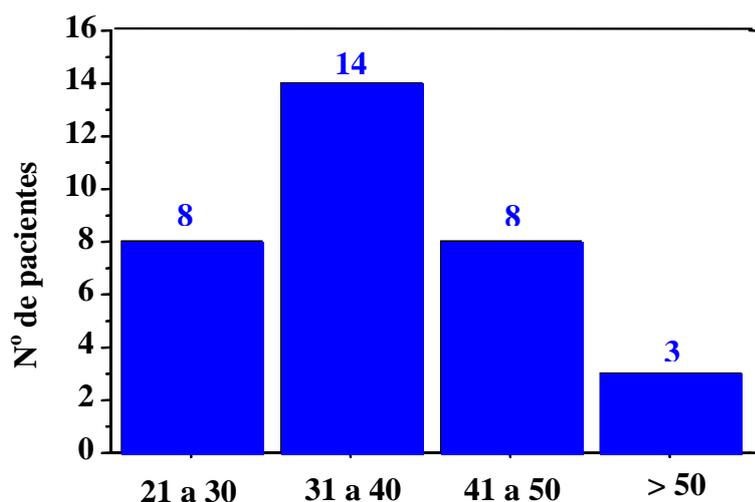
Com relação à procedência, a maioria dos indivíduos acometidos é da cidade de Uberaba (45 %) e em relação ao óbito, vinte quatro (72,7%) dos trinta e três faleceram (dados não mostrados) em relação a amostragem estudada.



**Figura 6:** Sorologia para HIV de pacientes com criptococose atendidos no HE-UFTM no período de dezembro de 2001 a julho de 2005.



**Figura 7:** Distribuição por sexo (%) dos pacientes com criptococose atendidos no Hospital Escola da UFTM no período de dezembro de 2001 a julho de 2005.



**Figura 8:** Faixa etária dos pacientes com criptococose atendidos no Hospital Escola da UFTM no período de dezembro de 2001 a julho de 2005.

# **Susceptibilidade aos antifúngicos**

Após identificação das variedades de *C. neoformans* mais encontradas no Hospital Escola da UFTM, passamos a investigar, para cada isolado, a concentração inibitória mínima (CIM) *in vitro* dos antifúngicos.

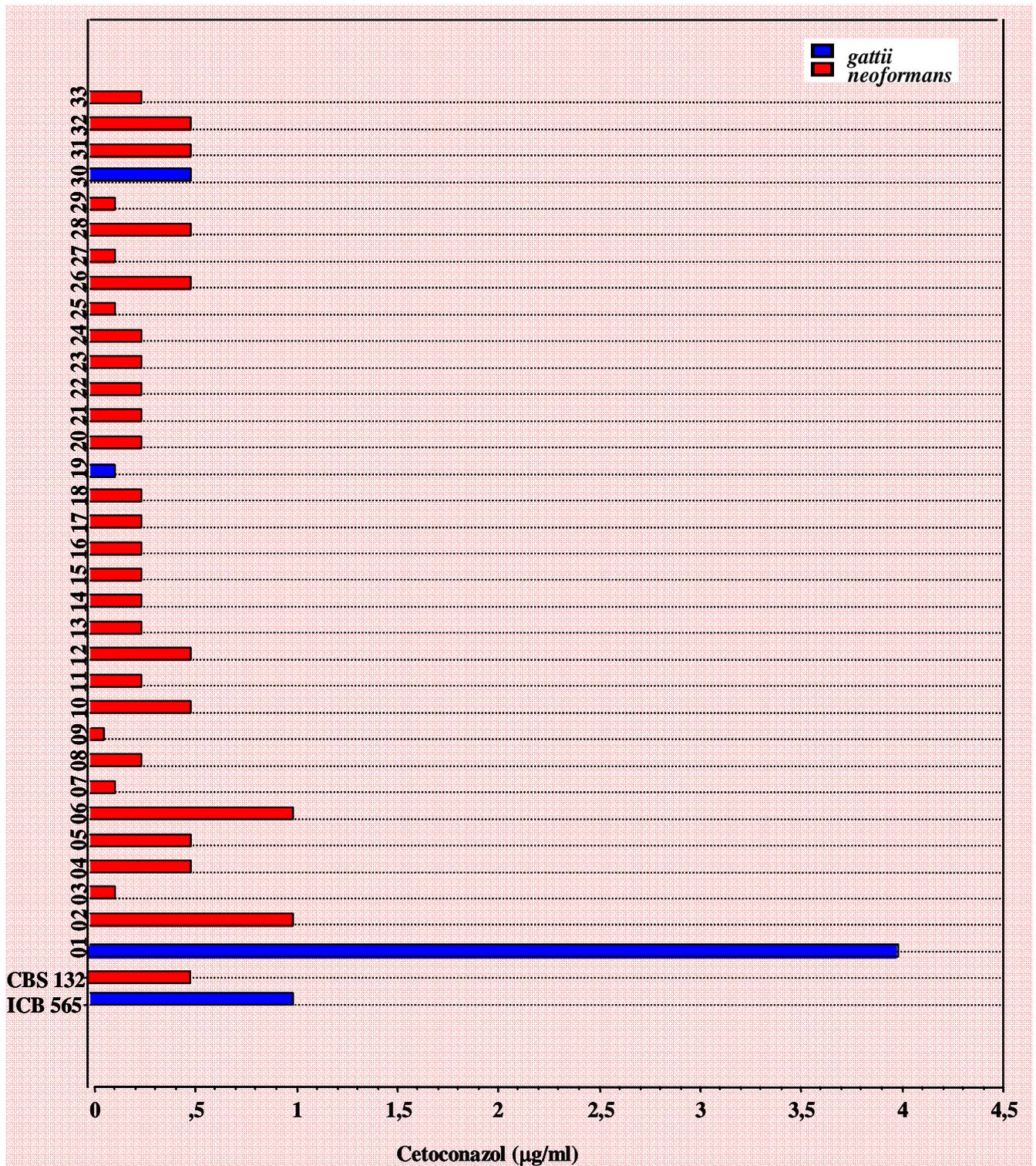
O valores de CIM para o cetoconazol (figura 9), frente aos diferentes isolados da variedade *neoformans* variaram de 0,125 a 1,0 µg/mL, sendo que todos os isolados desta variedade apresentaram susceptibilidade a este antifúngico. Por outro lado, a variedade *gattii* apresentou uma variação de 0,125 a 4,0 µg/mL sendo que um dos isolados encontrados foi classificado como dose dependente (isolado n° 01), apresentando uma CIM de 4,0 µg/mL.

Para o antifúngico fluconazol (figura 10) a variação da CIM foi de 0,25 a 8,0 µg/mL frente a variedade *neoformans* indicando que os isolados desta variedade foram susceptíveis a este antifúngico. No entanto para as amostras de variedade *gattii* encontramos valores entre 0,25 e 16 µg/mL, com um dos isolados sendo classificado como dose dependente (isolado n° 01 com CIM de 16 µg/mL).

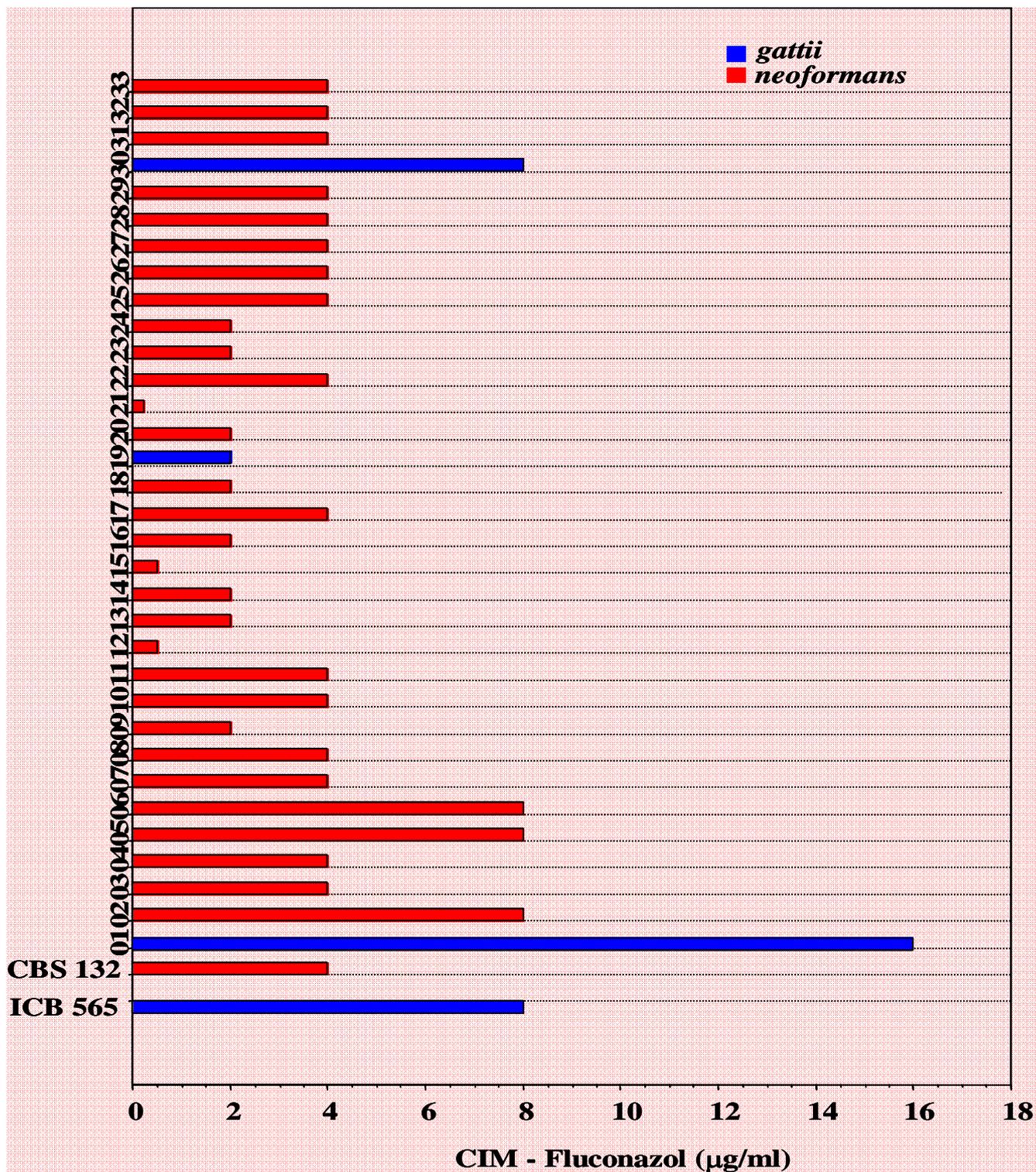
A variação da CIM para o itraconazol (figura 11) foi de 0,625 a 1,0 µg/mL para as variedades *neoformans* e *gatti*, com a maioria dos isolados apresentando susceptibilidade a este antifúngico. Foram encontradas duas amostras resistentes (isolado n° 01 com CIM = 1,0 µg/mL , e isolado n° 05 com CIM = 1,0 µg/mL ), sendo uma de cada variedade.

Em relação a anfotericina B (figura 12) os valores de CIM para a variedade *neoformans* foram de 0.625 a 2,0 µg/mL indicando que a maioria das amostras foi susceptível *in vitro* à ação deste antifúngico. Com relação à variedade *gattii* encontramos uma variação de 0,125 a 2,0 µg/mL. Detectamos cinco amostras resistentes sendo três amostras de variedade *neoformans* (isolados n<sup>os</sup> 2, 4 e 6), com CIM igual a 1 µg/mL e duas amostras com CIM igual a 2 µg/mL (isolados n<sup>os</sup> 1 e 5), sendo uma de cada variedade.

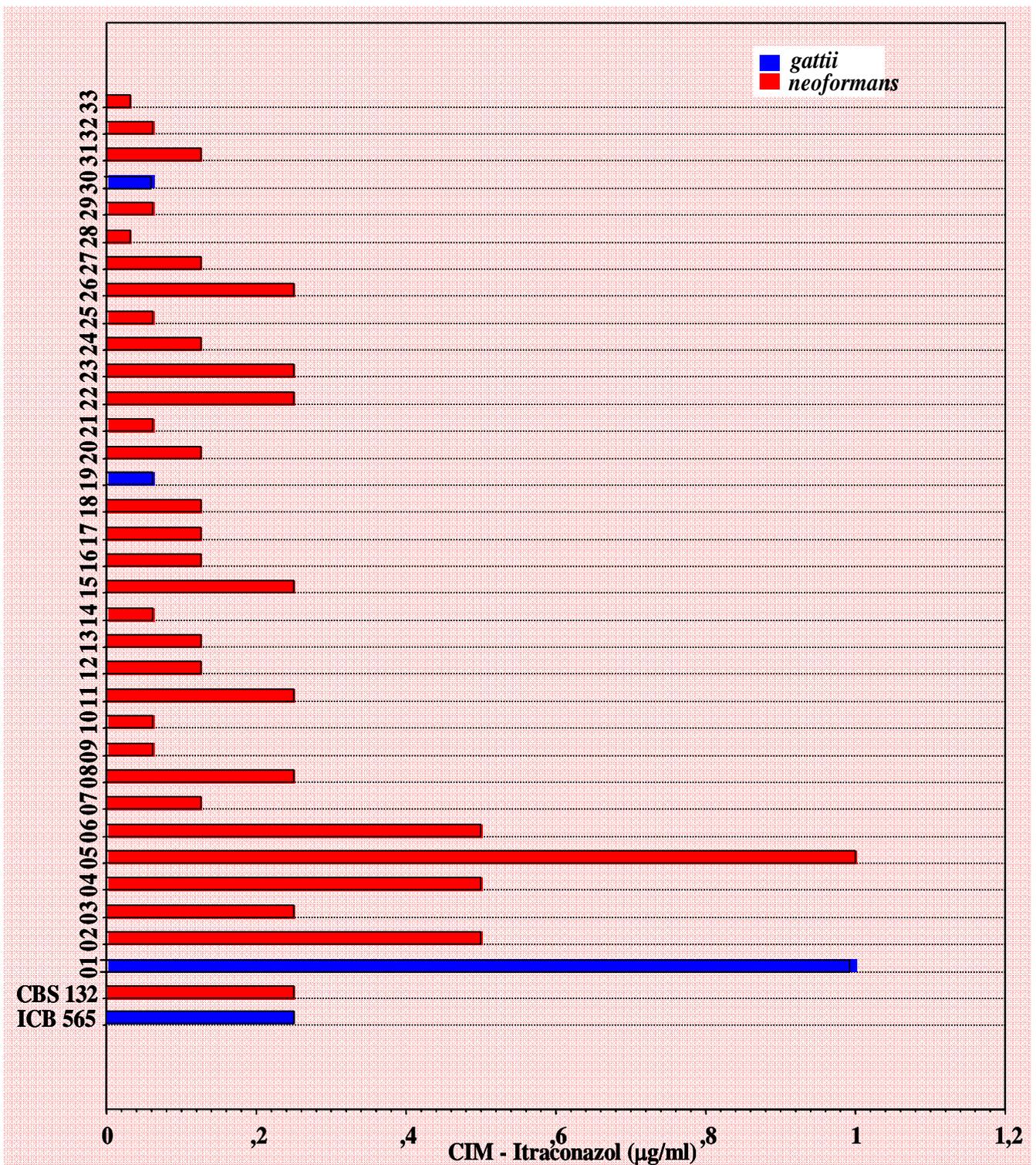
Na tabela II apresentamos a mediana e os valores máximos e mínimos de CIM para os quatro antifúngicos estudados frente às variedades de *C. neoformans* isoladas.



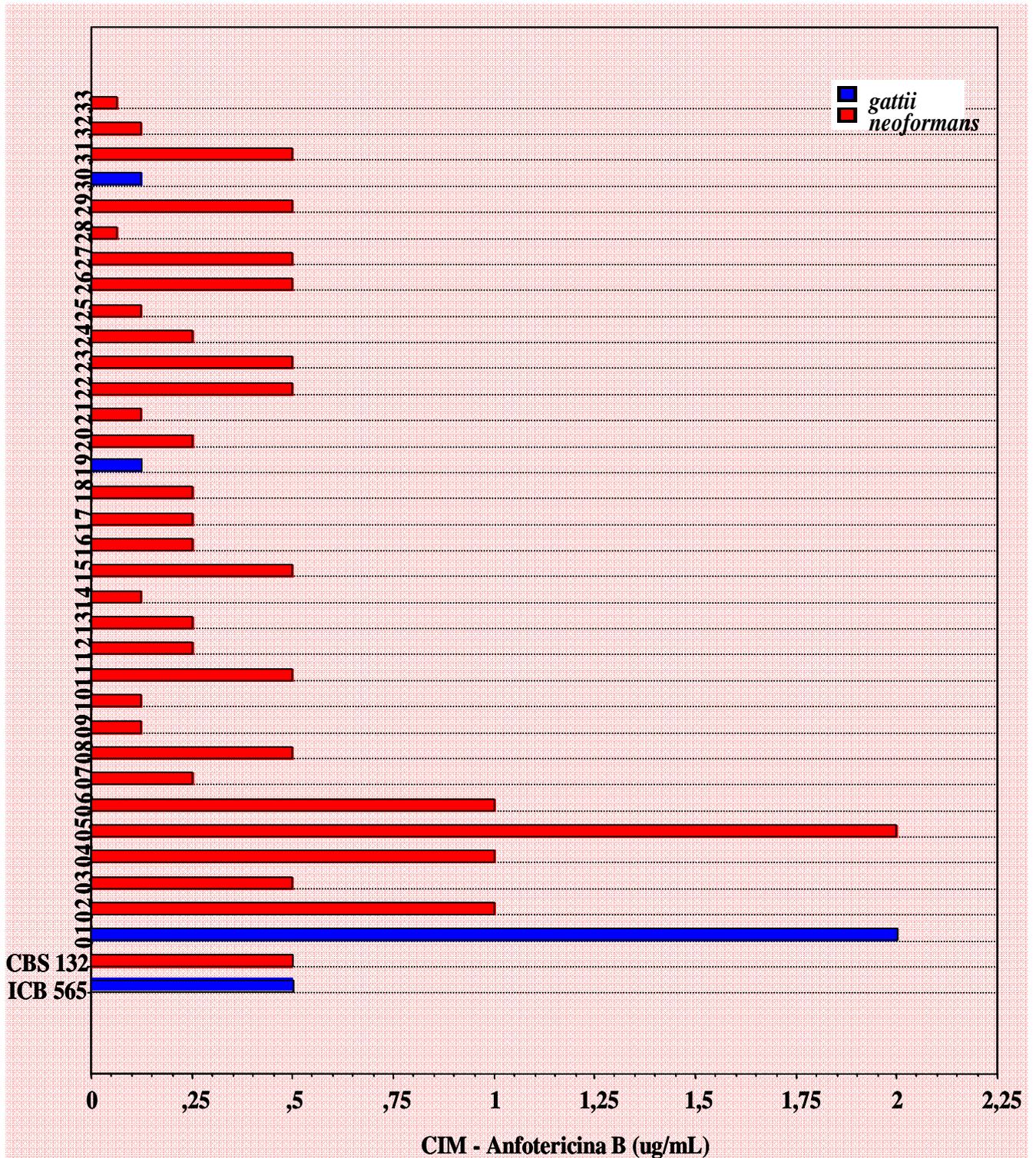
**Figura 9:** Susceptibilidade *in vitro* de isolados de *C. neoformans* ao cetoconazol avaliada pelo método de microdiluição em caldo. Os valores representam a concentração inibitória mínima (CIM) expressos em µg/mL frente aos diferentes isolados (numerados de 01 a 33). CBS 132 representa amostra controle de *C. neoformans* variedade *neoformans* (sorotipo A) e ICB565 representa amostra controle de *C. neoformans* variedade *gattii* (sorotipo B), ambos cedidos pela UFGO.



**Figura 10:** Susceptibilidade *in vitro* de isolados de *C. neoformans* ao fluconazol avaliada pelo método de microdiluição em caldo. Os valores representam a concentração inibitória mínima (CIM) expressos em µg/mL frente aos diferentes isolados (numerados de 01 a 33). CBS 132 representa amostra controle de *C. neoformans* variedade *neoformans* (sorotipo A) e ICB565 representa amostra controle de *C. neoformans* variedade *gattii* (sorotipo B), ambos cedidos pela UFGO.



**Figura 11:** Susceptibilidade *in vitro* de isolados de *C. neoformans* ao itraconazol avaliada pelo método de microdiluição em caldo. Os valores representam a concentração inibitória mínima (CIM) expressos em µg/mL frente aos diferentes isolados (numerados de 01 a 33). CBS 132 representa amostra controle de *C. neoformans* variedade *neoformans* (sorotipo A) e ICB565 representa amostra controle de *C. neoformans* variedade *gattii* (sorotipo B), ambos cedidos pela UFGO.



**Figura 12:** Susceptibilidade *in vitro* de isolados de *C. neoformans* a anfotericina B avaliada pelo método de microdiluição em caldo. Os valores representam a concentração inibitória mínima (CIM) expressos em µg/mL frente aos diferentes isolados (numerados de 01 a 33). CBS 132 representa amostra controle de *C. neoformans* variedade *neoformans* (sorotipo A) e ICB565 representa amostra controle de *C. neoformans* variedade *gattii* (sorotipo B), ambos cedidos pela UFGO.

**Tabela II:** Susceptibilidade a antifúngicos de variedades de *C. neoformans* isoladas de pacientes atendidos no HE-UFTM de dezembro de 2001 a julho de 2005.

Variedades testadas	Mediana Variação	Cetoconazol ( $\mu\text{g/ml}$ )	Fluconazol ( $\mu\text{g/ml}$ )	Itraconazol ( $\mu\text{g/ml}$ )	Anfotericina-B ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> (n = 31)	Mediana Variação	0,250 (0,125- 1,00)	4,000 (0,25 - 8,0)	0,125 (0,0625 - 1,0)	0,250 (0,0625 - 2,0)
<i>C. neoformans</i> var. <i>gattii</i> (N = 4)	Mediana Variação	0,750 (0,1250- 4,000)	8,000 (0,25 - 16)	0,157 (0,0625 - 1,0)	0,313 (0,125 - 2,0)
Total (n = 35)	Mediana Variação	0,250 (0,250 - 4,000)	4,000 (0,25 - 16)	0,125 (0,0625 - 1,0)	0,250 (0,0625 - 2,0)

Quanto ao local de isolamento das amostras de *C. neoformans* podemos observar que a concentração inibitória mínima (CIM) frente aos antifúngicos mostrou, para o cetoconazol, valor máximo de CIM mais elevado para os isolados do LCR (tabela III). O fluconazol apresentou valor máximo de CIM mais elevado para isolados de lavado brônquico (tabela III). Os antifúngicos itraconazol e anfotericina B também apresentaram valores máximos de CIM para isolados de LCR (tabela III) quando comparados com os isolados de sangue, pele e lavado-brônquico.

Tabela III - Susceptibilidade *in vitro* de isolados de *C. neoformans* aos antifúngicos, cetoconazol, fluconazol, itraconazol e anfotericina B avaliada pelo método de microdiluição em caldo, com relação ao local de isolamento.

Local de isolamento	Nº de isolados	Cetoconazol (CIM µg/mL)	Fluconazol (CIM µg/mL)	Itraconazol (CIM µg/mL)	Anfotericina B (CIM µg/mL)
LCR	28	4,00	16,00	1,00	2,00
Lavado brônquico	02	1,00	8,00	0,12	0,12
Sangue	02	0,50	4,00	0,12	0,25
Raspado de lesão	01	0,06	2,00	0,06	0,06

Susceptibilidade *in vitro* de isolados de *C. neoformans* aos antifúngicos, cetoconazol, fluconazol, itraconazol, e anfotericina B, avaliada pelo método de microdiluição em caldo, em relação ao local de isolamento (LCR, lavado brônquico, sangue e raspado de lesão). A tabela mostra os valores máximos de CIM distribuídos por local de isolamento das amostras e expressos em µg/mL frente aos diferentes isolados.

**Resposta imune *in vitro* às  
variedades do *C. neoformans***

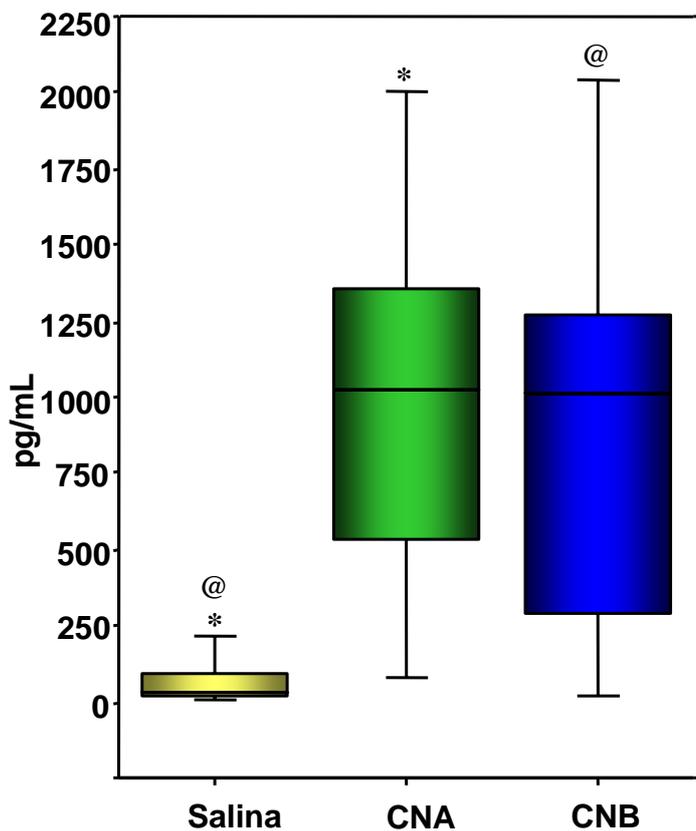
A resposta imune *in vitro* foi avaliada pela quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10), espécies reativas de oxigênio (ERO) e óxido-nítrico (NO) produzidos em resposta à estimulação *in vitro* com às variedades de *C. neoformans*.

***“C. neoformans variedade gattii e C. neoformans variedade neoformans induzem à produção de quantidades similares de TNF- $\alpha$  por leucócitos humanos”***

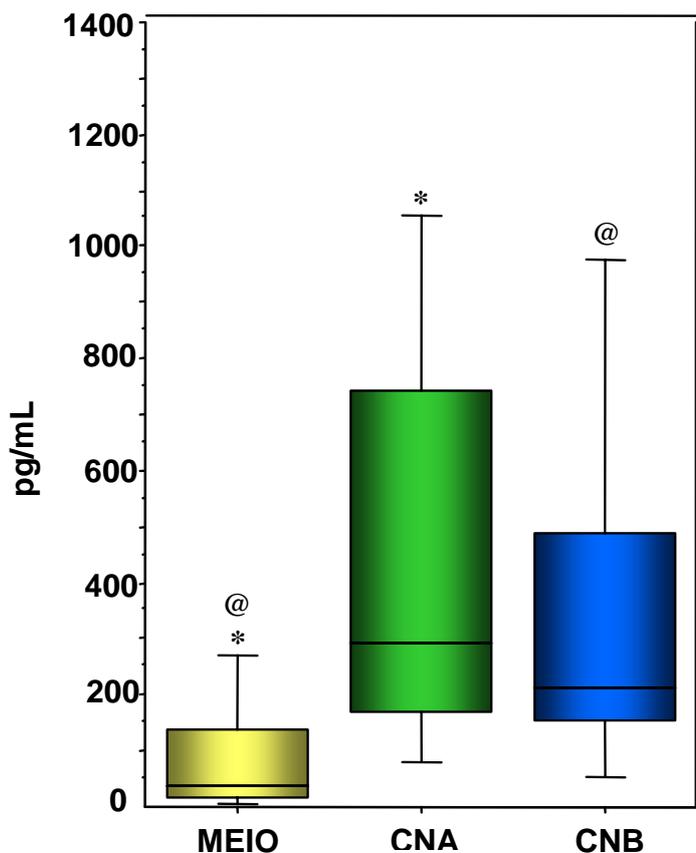
A produção da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  após estimulação de leucócitos de sangue total com as variedades de *C. neoformans* foi avaliadas por ELISA em sobrenadantes de cultura. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as variedades *neoformans* e *gattii* (figura 13).

Quando isolamos as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), observamos uma tendência à detecção de níveis mais elevados de TNF- $\alpha$  nos sobrenadantes de cultura que foram estimuladas com a variedade *neoformans*, se comparados com a variedade *gattii*, porém sem significância estatística (figura 14).

As variedades de *C. neoformans* foram capazes de estimular uma produção significativa de TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) em comparação ao controle negativo (somente meio de cultura ou salina), tanto nos ensaios de sangue total quanto naqueles em que foram utilizadas células mononucleares purificadas (figuras 13 e 14).



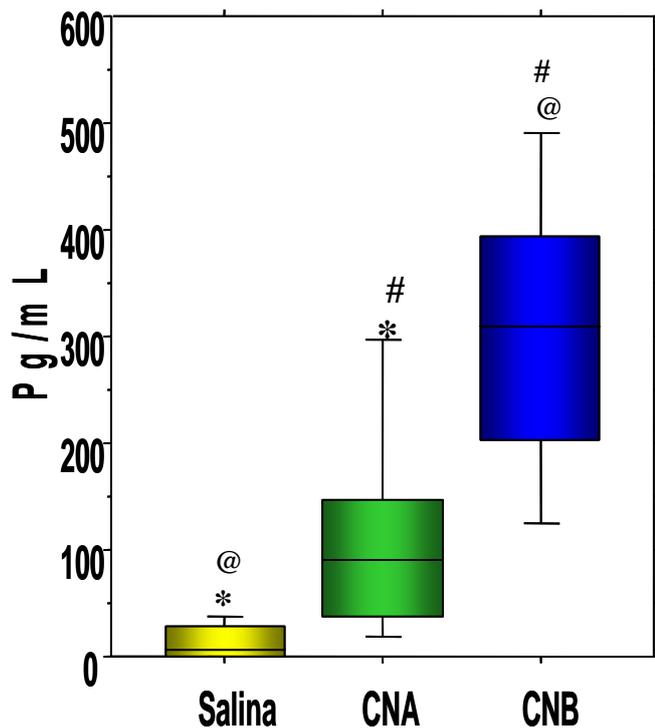
**Figura 13:** Produção de TNF $\alpha$  por leucócitos de sangue total humano obtido de doadores voluntários saudáveis (n=10) após estimulação *in vitro* com variedades de *C. neoformans*. Os leucócitos foram cultivadas na presença de  $1 \times 10^7$  células de fungo da variedade *neoformans* (CNA), da variedade *gattii* (CNB) ou somente salina. A produção de TNF $\alpha$  foi quantificada por ELISA em sobrenadantes de 18 horas de cultura. Os resultados estão expressos em picogramas por mililitro (pg/mL) e representados pela mediana em gráfico de box. A presença de símbolos iguais (\*,@) representa diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 14:** Produção de TNF $\alpha$  por células mononucleares humanas obtidas de doadores voluntários saudáveis (n=10) após estimulação *in vitro* com variedades de *C. neoformans*. As células mononucleares humanas ( $1 \times 10^6$ ) foram cultivadas na presença de células de fungo ( $1 \times 10^7$ ) da variedade *neoformans* (CNA), da variedade *gattii* (CNB) ou somente meio de cultura (Meio). A produção de TNF $\alpha$  foi quantificada por ELISA em sobrenadantes de 18 horas de cultura. Os resultados estão expressos em picogramas por mililitro (pg/mL) e representados pela mediana em gráfico de box. A presença de símbolos iguais (\*,@) representa diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

**“O *C. neoformans* var. *gattii* induz níveis mais altos de produção da citocina anti-inflamatória IL-10 quando comparado à variedade *neoformans*”**

A estimulação de leucócitos de sangue total humano de indivíduos saudáveis com o *C. neoformans* variedade *gattii* induz a produção de níveis mais elevados de IL-10 ( $p < 0,05$ ) se comparados à estimulação com a variedade *neoformans* (figura 15).

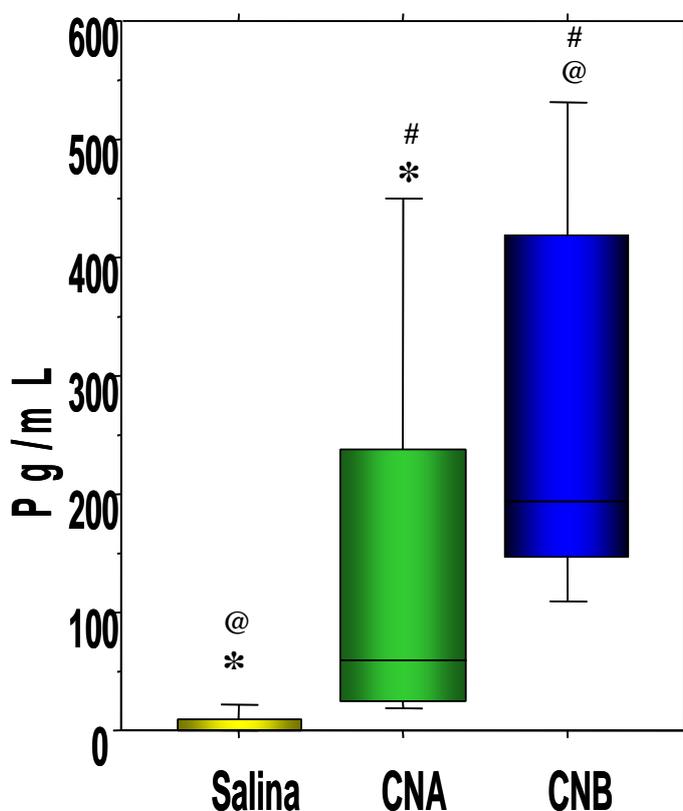


**Figura 15:** Produção de IL-10 por leucócitos de sangue total humano obtido de doadores voluntários saudáveis ( $n=10$ ) após estimulação *in vitro* com variedades de *C. neoformans*. Os leucócitos foram cultivadas na presença de  $1 \times 10^7$  células de fungo da variedade *neoformans* (CNA), da variedade *gattii* (CNB) ou somente salina. A produção de IL-10 foi quantificada por ELISA em sobrenadantes de 18 horas de cultura. Os resultados estão expressos em picogramas por mililitro (pg/mL) e representados pela mediana em gráfico de box. A presença de símbolos iguais (\*, @, #) representa diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

A seguir, foi isolada a fração de células mononucleares do sangue periférico de voluntários saudáveis. As PBMCs foram então estimuladas *in vitro* com as variedades de *C. neoformans* e os níveis de IL-10 presentes nos sobrenadantes de cultura foram quantificados por ELISA.

Os resultados obtidos mostram que a estimulação *in vitro* com a variedade *gattii* induz a produção de níveis mais elevados de IL-10 quando comparada com a variedade *neoformans* (figura 16), sendo as diferenças encontradas estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Controles negativos de estimulação foram realizados sem a presença do *C. neoformans* para ambos os casos (sangue total e PBMCs) e os níveis de IL-10 detectados foram bastante reduzidos e inferiores ( $p < 0,05$ ) àqueles encontrados após a estimulação com as variedades deste fungo.

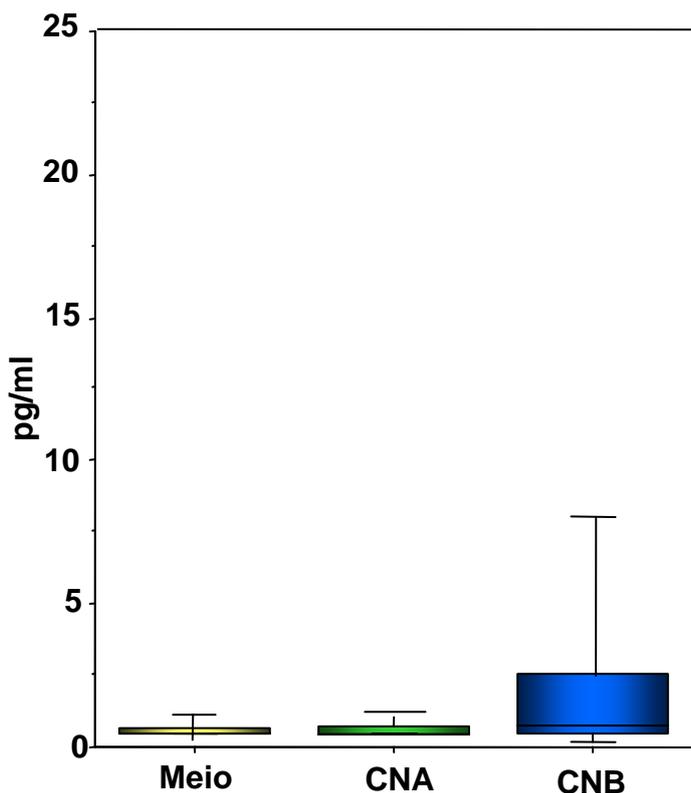


**Figura 16:** Produção de IL-10 por células mononucleares humanas obtidas de doadores voluntários saudáveis ( $n=10$ ) após estimulação *in vitro* com variedades de *C. neoformans*. As células mononucleares humanas ( $1 \times 10^6$ ) foram cultivadas na presença de células de fungo ( $1 \times 10^7$ ) da variedade *neoformans* (CNA), da variedade *gattii* (CNB) ou somente meio de cultura (MEIO). A produção de IL-10 foi quantificada por ELISA em sobrenadantes de 18 horas de cultura. Os resultados estão expressos em picogramas por mililitro (pg/mL) e representados pela mediana em gráfico de box. A presença de símbolos iguais (\*, @, #) representa diferenças estatisticamente significante entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

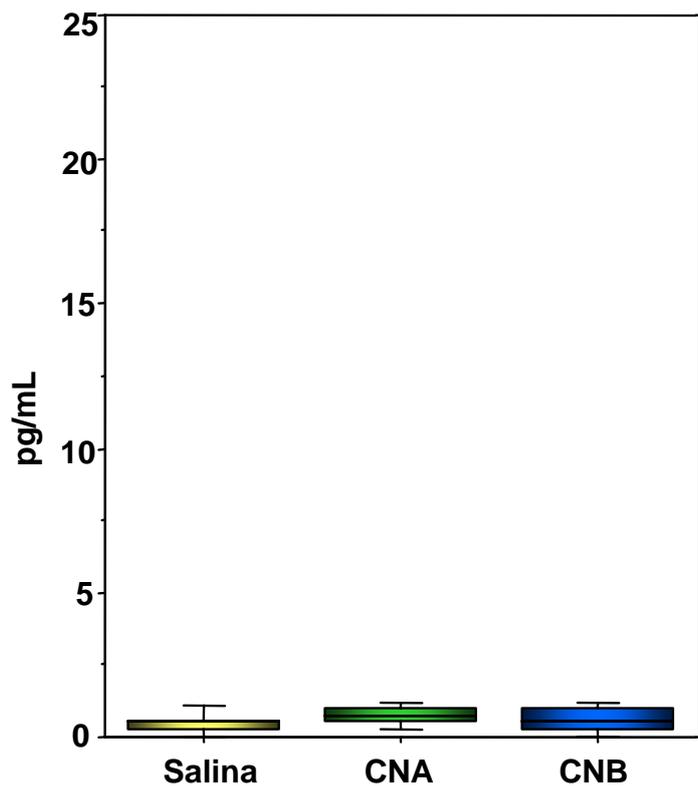
**“*C. neoformans* variedade *gattii* e *C. neoformans* variedade *neoformans* induzem à produção de níveis similares de IFN- $\gamma$  por leucócitos humanos”**

Os níveis de IFN $\gamma$  encontrados após estimulação de leucócitos de sangue total de indivíduos saudáveis com as variedades de *C. neoformans* foram muito baixos tanto para os estimulados com a variedade *neoformans* quanto para variedade *gattii*, não apresentando diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (figura 17).

As células mononucleares isoladas do sangue periférico estimuladas com variedades de *C. neoformans* também apresentaram baixos níveis de IFN $\gamma$  nos sobrenadantes de cultura, sendo discretamente mais elevados quando estimulados com variedade *gattii*, porém sem significância estatística (figura 18).



**Figura 17:** Produção de IFN- $\gamma$  por células mononucleares humanas obtidas de doadores voluntários (n=10) após estimulação *in vitro* com variedades de *C. neoformans*. As células mononucleares humanas ( $1 \times 10^6$ ) foram cultivadas na presença de células de fungo ( $1 \times 10^7$ ) da variedade *neoformans* (CNA), da variedade *gattii* (CNB) ou somente meio de cultura (Meio). A produção de IFN $\gamma$  foi quantificada por ELISA em sobrenadantes de 18 horas de cultura. Os resultados estão expressos em picogramas por mililitro (pg/mL) e representados pela mediana em gráfico de box, não existindo diferenças estatisticamente significativas entre os grupos considerando  $p < 0,05$ .



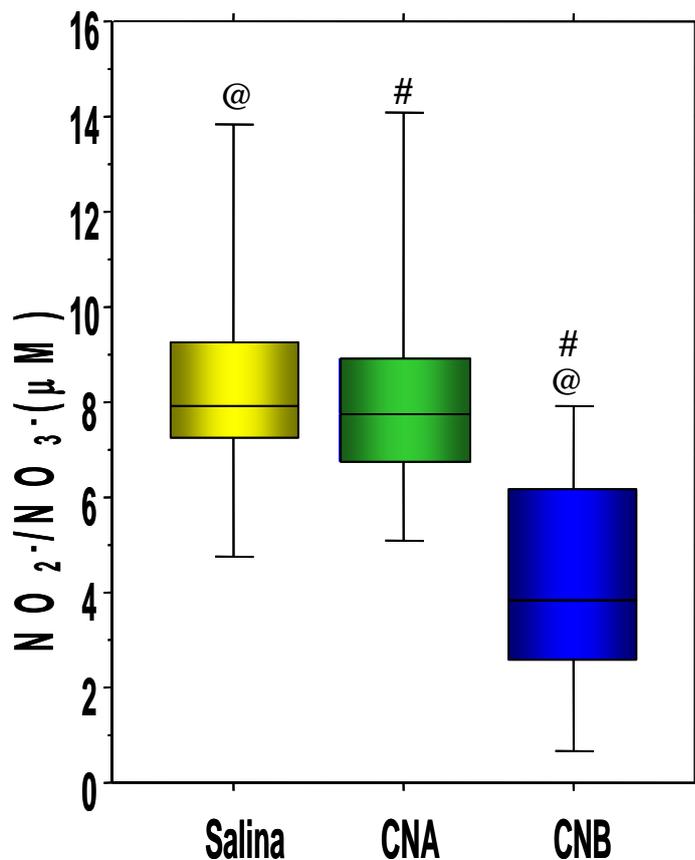
**Figura 18:** Produção de IFN $\gamma$  por leucócitos de sangue total humano obtido de doadores voluntários saudáveis (n=10) após estimulação *in vitro* com variedades de *C. neoformans*. Os leucócitos foram cultivadas na presença de  $1 \times 10^7$  células de fungo da variedade *neoformans* (CNA), da variedade *gattii* (CNB) ou somente salina. A produção de IFN $\gamma$  foi quantificada por ELISA em sobrenadantes de 18 horas de cultura. Os resultados estão expressos em picogramas por mililitro (pg/mL) e representados pela mediana em gráfico de box não existindo diferenças estatisticamente significantes entre os grupos considerando  $p < 0,05$ .

**Produção de óxido-nítrico e espécies reativas de oxigênio (ERO)**

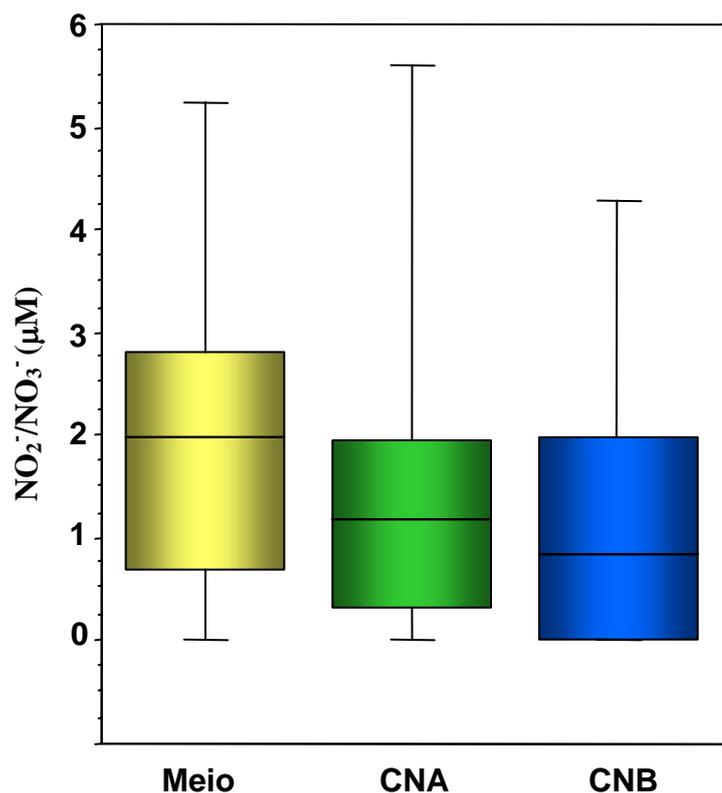
## Produção de óxido nítrico após estimulação com as variedades de *C. neoformans*

Os resultados da produção de óxido nítrico por leucócitos de sangue total humano, após estimulação com as variedades de *C. neoformans* estão apresentados na figura 19. Foram encontrados níveis reduzidos de NO nos sobrenadantes de leucócitos humanos estimulados com a variedade *gattii*, quando comparados à variedade *neoformans*, com diferenças estatisticamente significativas  $p < (0,05)$ .

Os resultados obtidos após a estimulação das células mononucleares isoladas do sangue periférico com as variedades de *C. neoformans* mostraram níveis de óxido nítrico similares entre os sobrenadantes estimulados com a variedade *neoformans* ou com a variedade *gattii* (figura 20).



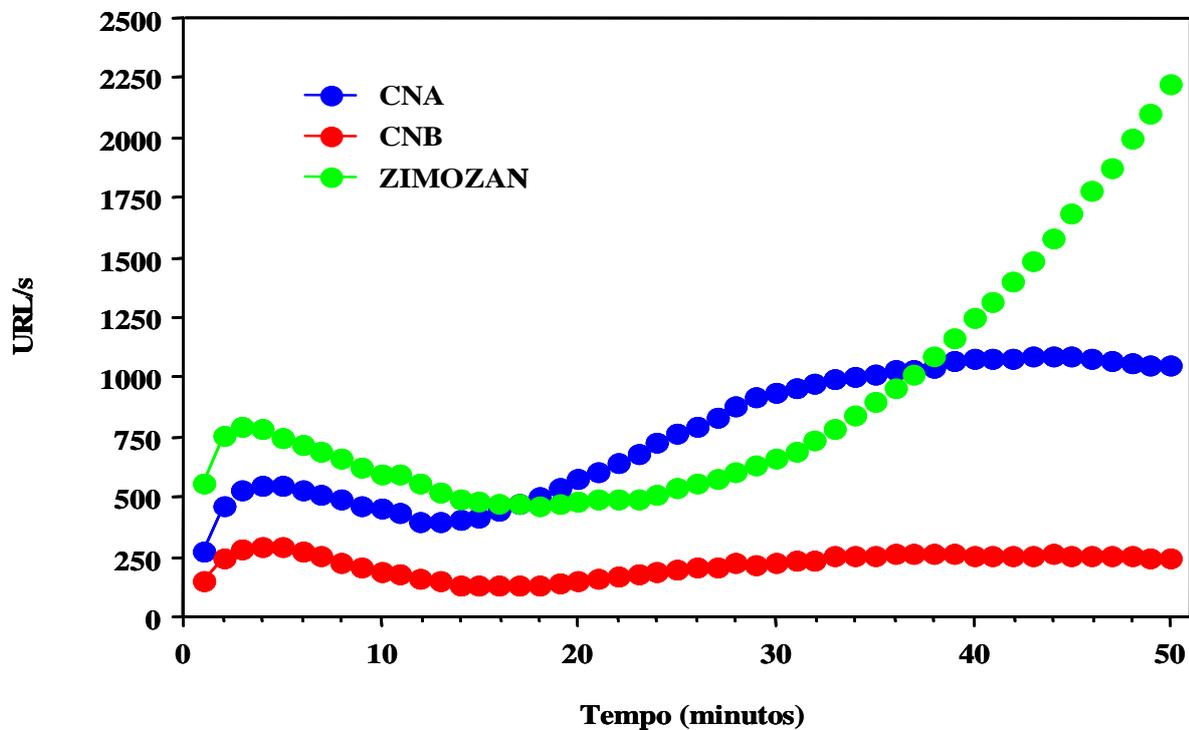
**Figura 19:** Produção de óxido nítrico por leucócitos de sangue total humano obtido de doadores voluntários saudáveis ( $n=10$ ) após estimulação *in vitro* com variedades de *C. neoformans*. Os leucócitos ( $1 \times 10^6$ ) foram cultivadas na presença de células de fungo ( $1 \times 10^7$ ) da variedade *neoformans* (CNA), da variedade *gattii* (CNB) ou somente meio de cultura (Meio). A produção de óxido nítrico foi quantificada por reação de Griess, em sobrenadantes de 18 horas de cultura. Os resultados estão expressos em picogramas por mililitro (pg/mL) e representados pela mediana em gráfico de box. A presença de símbolos igual (@,#) representa diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 20:** Produção de oxido nítrico por células mononucleares humanas obtidas de doadores voluntários saudáveis (n=10) após estimulação *in vitro* com variedades de *C. neoformans*. As células mononucleares humanas ( $1 \times 10^6$ ) foram cultivadas na presença de células de fungo ( $1 \times 10^7$ ) da variedade *neoformans* (CNA), da variedade *gattii* (CNB) ou somente meio de cultura (Meio). A produção de oxido nítrico foi quantificada por reação de Griess, em sobrenadantes de 18 horas de cultura. Os resultados estão expressos em picogramas por mililitro (pg/mL) e representados pela mediana em gráfico de Box. Não existindo diferenças estatisticamente significantes entre os grupos considerando  $p < 0,05$ .

## Produção de espécies reativas de oxigênio por granulócitos humanos após estimulação com as variedades de *C. neoformans*

Nossos resultados (figura 21) mostraram uma menor produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), por granulócitos purificados a partir do sangue periférico de doadores saudáveis estimulados com *C. neoformans* variedade *gattii*, se comparados à variedade *neoformans*. Os parâmetros de pico máximo e área total sob a curva no ensaio de quimioluminescência foram maiores para a variedade *neoformans* indicando uma produção mais elevada de ERO por granulócitos humanos quando estimulados por esta variedade (tabela IV).



**Figura 21:** Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), por granulócitos de doadores voluntários saudáveis após estimulação *in vitro* com variedades de *C. neoformans*. Os granulócitos ( $1 \times 10^6$ ) foram cultivados na presença de células de fungo ( $1 \times 10^7$ ) da variedade *neoformans* (CNA), da variedade *gattii* (CNB) ou com zimozan. A produção de ERO foi quantificada por ensaio de quimioluminescência (50 minutos) em luminômetro (Lumat LB 9501 Berthold) e os resultados estão expressos em unidades relativas de luz por segundo URL/s. A figura mostra um experimento representativo de quatro experimentos similares realizados.

**Tabela IV: Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) por granulócitos humanos na presença de variedades do *C. neoformans*.**

Estímulo	Pico Máximo (mV)	Tempo gasto (minutos)	Área sob a curva (cm <sup>2</sup> )
Zim	1250	45	46,34
CNA	1090	45	42,65
CNB	265	38	10,77

Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), por granulócitos humanos de doadores voluntários saudáveis após estimulação *in vitro* com variedades de *C. neoformans*. Os granulócitos purificados ( $1 \times 10^6$ ) foram cultivados na presença de células de fungo ( $1 \times 10^7$ ) da variedade *neoformans* (CNA), da variedade *gattii* (CNB) ou com zimozan (Zim). A produção de ERO foi quantificada por ensaio de quimioluminescência (50 minutos) em luminômetro (Lumat LB 9501 Berthold). Os resultados estão expressos em valores de pico máximo em unidades relativas de luz por segundo URL/s, área total sob a curva em cm<sup>2</sup> (calculada pelo software Image J versão 1.32) e tempo em minutos para o pico máximo de produção de espécies reativas de oxigênio de um experimento, representativo de quatro experimentos similares realizados.

**Discussão**

A neurocriptococose, tendo como manifestação clínica mais frequente a meningoencefalite, é a micose profunda mais comum entre pacientes acometidos pela SIDA e apresenta-se altamente responsável não só pela morbidade, mas também pela mortalidade entre estes (ROZEMBAUM; RIOS-GONÇALVES, 1994; MITCHELL; PERFECT, 1995; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998). Segundo Branchini et al., (2000), a grande maioria dos casos de criptococose ocorre em pacientes imunossuprimidos, principalmente HIV positivos. Este fato é responsável pela mudança na epidemiologia desta doença, pois, antes do início da epidemia de SIDA, a criptococose ocorria principalmente em pacientes acometidos por doenças imunossupressoras graves como as doenças linfoproliferativas, nos pacientes em terapia com corticoesteróides, na sarcoidose, em transplantados de órgãos e ocasionalmente em portadores de diabetes mellitus. Em nosso estudo, a maioria dos isolados de *C. neoformans* foram obtidos de pacientes HIV positivos (81,8%) os quais em grande parte estavam acometidos por meningoencefalites. Dados equivalentes foram encontrados por BRANDÃO et al., (2004) mostrando que a criptococose ocorre, na maioria dos casos, em pacientes com alto grau de comprometimento imunológico.

Dentre os pacientes pesquisados em nosso estudo, 48% apresentavam infecção pulmonar. Esse dado sugere a disseminação do *C. neoformans* a partir do sistema respiratório, porta de entrada da infecção, atingindo o sistema nervoso central. Em apenas 02 (6,06%) dos pacientes aparentemente não ocorreu à disseminação, apresentando somente a fase pulmonar da doença diagnosticada por hemocultura. Nossos dados são similares aos de Laerte (2003) que encontrou a forma pulmonar isolada em 6,8% dos casos de criptococose.

Nosso estudo identificou apenas um paciente com criptococose cutânea apresentando lesões no couro cabeludo, de onde foram isolados os fungos. A

criptococose cutânea primária resulta da inalação do *Cryptococcus* sem o desenvolvimento de lesão pulmonar ou, menos freqüentemente, da inoculação local. É infreqüente e mesmo nos casos documentados é difícil de excluir a presença de doença sistêmica. Mentz et al. (2001) relatam que as manifestações cutâneas ocorrem em 10 a 15 % dos casos e, na maioria das vezes, precede o surgimento de doença sistêmica. É interessante notar que o paciente com criptococose cutânea de nosso estudo estava infectado pelo *C. neoformans* variedade *gattii*. Este paciente não apresentava nenhum fator predisponente para o desenvolvimento da infecção e não tinha nenhuma doença de base associada.

A maioria dos casos diagnosticados de criptococose apresenta o *C. neoformans* variedade *neoformans* como principal agente etiológico. Esta variedade também é considerada a principal responsável por criptococose em pacientes com SIDA, enquanto o *C. neoformans* variedade *gattii* tem sido raramente relatado em pacientes infectados com o vírus HIV, mesmo em áreas tropicais e subtropicais onde essa variedade é mais encontrada (MITCHELL; PERFECT, 1995; SPEED et al., 1995). Nossos resultados mostram que dos trinta e três isolados de *C. neoformans*, trinta (91%) foram da variedade *neoformans* e três (9%) da variedade *gattii*. Brandão et al., 2004, relata que a criptococose além de acometer aqueles pacientes com deficiência da resposta imune celular, também pode ocorrer mais raramente em pessoas sem nenhum fator imunossupressor detectado, sendo que em 4,2% dos pacientes não foi detectado nenhum fator predisponente para o desenvolvimento da infecção pelo *C. neoformans*. Em nosso trabalho encontramos dois isolados de *C. neoformans* variedade *gattii* em pacientes HIV negativos. Branchini et al., 2000, relatam que o *C. neoformans* variedade *neoformans* é responsável por mais de 90% das infecções nos pacientes com SIDA, enquanto a

variedade *gattii* age como patógeno primário, infectando pacientes imunocompetentes residentes em área rural (CORRÊA et al., 1999).

No Hospital Escola da UFTM, no período compreendido entre dezembro de 2001 a julho de 2005, a criptococose ocorreu mais freqüentemente em pacientes na faixa etária de trinta a quarenta anos de idade (45% dos casos). Segundo Corrêa et al., (1999) a criptococose tem sido descrita em pacientes de diversas faixas etárias. Todavia, Pinner; Hajjeh; Powderly, (1995) relatam que as faixas etárias compreendidas entre 30 a 40 anos (42%) e entre 40 a 50 anos (29%) são as mais freqüentes, sendo rara a criptococose infantil.

Altas taxas de aparecimento de doenças fúngicas e a reincidência destas tem sido uma preocupação crescente entre os clínicos, considerando o potencial emergente de resistência a antifúngicos entre os isolados de *C. neoformans* (PFALLER et al., 2005). A freqüência crescente de criptococose em pacientes imunocomprometidos e a existência de cepas de *C. neoformans* resistentes aos principais agentes antifúngicos utilizados tem dificultado a terapia contra esta doença. Diante disto, estudamos o perfil de sensibilidade de trinta e cinco amostras de *C. neoformans*, sendo trinta e uma da variedade *neoformans* e quatro da variedade *gattii*, frente a quatro antifúngicos.

A anfotericina B é considerada o tratamento de escolha como terapia inicial para criptococose (WHITE; ARMSTRONG, 1994). Em estudo realizado por De Bedoult et al. (1999), 10% dos isolados de *C. neoformans* var. *neoformans* foram considerados resistentes a este antifúngico. Tem sido descrita a resistência *in vitro* a anfotericina B bem como *in vivo* em pacientes com SIDA, (LOZANO-CHIU; PAETZNICK; GHANNOUM; REX, 1998; POWDERLY, 1990). Apesar disto, o número de pacientes com criptococose resistentes a anfotericina B é considerado pequeno (VANDEN et al., 1998). Em nosso estudo encontramos cinco (17.5%) cepas resistentes a anfotericina B

com duas apresentando CIM igual 2 µg/mL (5,7%) 1 sendo uma da variedade *neoformans* e outra da variedade *gattii* de acordo com padrões de resistencia proposta na literatura (NGUYEN; YU, 1998; LOSANO-CHIU, et al. 1998). Dentro deste contexto, o estudo de Trilles; Fernandez-Torres; Lazera; Wanke; Guarro (2004) mostra que, de uma forma geral, o *C. neoformans* variedade *gattii* é menos susceptível aos vários antifúngicos testados com exceção da fluocitocina e da anfotericina B. O aumento na síntese de óxido-nítrico por macrófagos estimulados por anfotericina B (TOHYAMA; KAWAKAMI; SAITO, 1996; MOZAFFARIAN; BERMAN; CASADEVALL, 1997), constitui-se em um mecanismo adicional de ação desta droga o que torna complexa e difícil a extrapolação direta dos resultados obtidos com a anfotericina B *in vitro* para os reais efeitos *in vivo*.

Embora o antifúngico cetoconazol não seja indicado para tratamento de meningoencefalites, ele foi incluído em nosso trabalho para avaliar uma possível resistência cruzada entre os azólicos. No estudo realizado por (ALVES et al., 2001), foram observados CIMs muito baixas para as amostras de *C. neoformans* investigadas. Em nosso trabalho, das trinta e cinco amostras estudadas, apenas uma, da variedade *gattii*, apresentou uma CIM elevada (igual 4 µg/mL), sendo que todos os outros isolados foram sensíveis, com CIMs menores que 1µg/mL.

Para o antifúngico fluconazol que é comumente utilizado em paciente com SIDA como preventivo de doenças fúngicas oportunistas, têm sido descrito o aparecimento de cepas resistentes, isoladas de pacientes com imunossupressão devido a tratamentos prolongados (ALVES; LOPES; COSTA ; KLOCK, 1997; ESPINEL-INGROFF et al., 1998). Também tem sido descrito que os isolados clínicos são menos susceptíveis ao fluconazol do que os isolados ambientais (ALVES et al., 2001). Encontramos neste trabalho apenas uma cepa da variedade *gattii* que foi classificada como dose dependente

apresentando um CIM igual a 16, sendo considerados sensíveis todos os outros isolados (ALLER et al.; 2000, NCCLS, 2002) mostraram que uma melhor resposta clínica a terapia era observada quando as amostras de *C. neoformans* apresentavam valores de CIM menores que 16 µg/mL e Larsen et al., (2005) relataram que os resultados de CIM *in vitro* correspondem ao efeito *in vivo* para o antifúngico fluconazol. O trabalho de Fernandes et al. (2003) mostra que isolados da variedade *gattii* apresentam maiores valores de CIM para o fluconazol quando comparados à variedade *neoformans*. Em um estudo realizado no sul do Brasil verificou-se que a susceptibilidade dos isolados *C. neoformans* frente ao fluconazol foi similar a estudos similares reportados nas Américas. Em Minas Gerais, isolados de *C. neoformans* apresentaram 100% de sensibilidade para fluconazol com CIMs  $\leq 16$  µg/mL (FRANZOT ; HAMDAN, 1996).

Com relação ao itraconazol, não detectamos um perfil distinto de susceptibilidade quando comparamos isolados da variedade *neoformans* com isolados da variedade *gattii*. Nosso estudo encontrou dez amostras com CIMs entre 0,25 a 0,5µg/mL e duas amostras resistentes com CIMs iguais a 1 µg/mL, sendo uma de cada variedade. Os dados da literatura mostram que para o itraconazol, são considerados resistentes os isolados de *C. neoformans* que apresentam CIM  $\geq 1$  µg/mL, e dose dependentes aqueles com valores entre 0,25 a 0,5 µg/mL (NGUYEN ; YU, 1998; VANDEN et al., 1998; LOSANO-CHIU, et al. , 1998).

Nosso estudo também mostrou que os *C. neoformans* isolados de LCR apresentaram CIMs mais elevados sendo encontrado cepas resistentes e doses dependentes. Para os isolados de lavado brônquico foram encontrados CIMs mais elevados somente para o fluconazol. O aparecimento de cepas de *C. meformans* resistentes está geralmente associado com infecções crônicas encontradas em pacientes imunocomprometidos com neurocriptococose, sendo mais facilmente encontrado, nestes

casos, cepas resistentes ou doses dependentes nas amostras de LCR rotineiramente utilizadas para o diagnóstico laboratorial destes pacientes (DELFINO, et al., 1994; SHOHAM, et al., 2001). Embora tenha sido isoladas somente duas cepas no lavado brônquico, estas também apresentaram CIMs mais elevados para fluconazol, devido ao seu uso constante por pacientes imunocomprometidos por SIDA, podendo o fungo inicialmente causar uma infecção pulmonar sintomática ou não e posteriormente disseminar-se para as meninges e causar neurocriptococose (BAKER; REBOLI, 1997). Assim se torna cada vez mais importante à realização de testes de susceptibilidade para isolados de *C. neoformans* para o controle das criptococoses pulmonares e neurocriptococose visando obter melhores resultados na terapia contra o *C. neoformans*.

Analisando todos os resultados de CIMs obtidos neste trabalho para os diferentes antifúngicos testados, podemos dizer que detectamos alguns isolados com CIMs elevados, tanto para a variedade *neoformans* quanto para a variedade *gattii*, mas não foi detectado um perfil distinto de susceptibilidade entre as variedades.

Tem sido descrito manifestações clínicas diferentes do hospedeiro, dependendo de qual variedade de *C. neoformans* é a causadora da infecção. Sabe-se que a variedade *gattii* pode causar meningoencefalites em indivíduos saudáveis, enquanto o mesmo não é conhecido para a variedade *neoformans*, comumente encontrada como causadora de doença em indivíduos imunodeprimidos (NARASIPURA; AULT; BEHR; CHATURVEDI; 2003). Além disto, a variedade *gattii* quando inoculada experimentalmente na cavidade peritoneal de camundongos mostrou-se mais patogênica do que a variedade *neoformans* (TORRES-RODRIGUES, MORERA; BARO; COROMINAS; CASTANEDA, 2003). Embora existam diversos relatos de comportamento clínico diferencial entre as variedades, poucos são os estudos descrevendo a resposta imune à variedade *gattii*. Neste trabalho realizamos uma

investigação comparativa *in vitro* de diversos parâmetros da resposta imunológica induzida pelas variedades do *C. neoformans* em células humanas. Os parâmetros investigados foram a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10), espécies reativas de oxigênio (ERO) e óxido-nítrico (NO).

Inicialmente avaliamos a produção da citocina pró-inflamatória, TNF- $\alpha$ , por leucócitos de sangue total estimulados com as variedades do *C. neoformans*. Os resultados obtidos mostraram uma produção equivalente de TNF- $\alpha$  por leucócitos de doadores voluntários saudáveis, independente da variedade de *C. neoformans* utilizada para estimulação. Resultados similares também foram obtidos quando trabalhamos com células mononucleares purificadas do sangue periférico. Observou-se uma tendência à produção de níveis mais elevados de TNF- $\alpha$  quando os PBMCs eram estimulados com a variedade *neoformans* se comparados à variedade *gattii*, porém sem significância estatística. Netea et al., (2004) demonstraram que indivíduos imunocomprometidos, apresentavam produção de baixos níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e altos níveis de IL-10 e que isto favorecia o desenvolvimento da meningite criptocócica, podendo esta situação ser induzida pelo *C. neoformans*. O TNF- $\alpha$  parece ser uma citocina importante para o hospedeiro no controle da criptococose. A neutralização parcial do TNF- $\alpha$  com anticorpos monoclonais em camundongos infectados experimentalmente com o *C. neoformans*, leva ao desenvolvimento de uma infecção fúngica crônica em animais imunocompetentes (HERRING et al., 2005). Pacientes que sobreviveram à criptococose apresentam níveis mais elevados de TNF- $\alpha$  no LCR quando comparados aos pacientes que vieram a óbito (SIDDIQUI et al., 2005) e existem casos descritos de uso de “infiximab” (anticorpo monoclonal anti-TNF- $\alpha$  disponível comercialmente) aumentando, nestes casos, a susceptibilidade a infecções oportunistas pelo *C. neoformans* (BUENTKE; SCHEYNIUS, 2003).

Sabe-se que as manoproteínas presentes na cápsula do *C. neoformans* são capazes de induzir a produção de TNF- $\alpha$  por leucócitos humanos (LEVITZ, 2002; PIETRELLA et al., 2002). Por outro lado, os polissacarídeos capsulares (GXM) não têm sido descritos como bons indutores da secreção de TNF- $\alpha$  por células humanas, dependendo fortemente da presença de outras moléculas, tais como as proteínas do sistema de complemento, para que sejam capazes de induzir níveis não muito elevados de TNF- $\alpha$  (CHAKA et al., 1997; LEVITZ, 2002). A dependência de proteínas do sistema do complemento para que o GXM seja capaz de induzir à produção de TNF- $\alpha$  também transforma o cérebro em um local imunologicamente privilegiado e relativamente seguro para o *C. neoformans*, devido à ausência ou inacessibilidade de um sistema do complemento funcional no sistema nervoso central (KOZEL, 1993). Os principais receptores descritos para os GXM em células humanas incluem as moléculas: CD14, TLR2 (receptor “toll-like” 2), TLR4 (receptor “toll-like” 4) e CD18 (SHOHAM; HUANG; CHEN; GOLENBOCK ; LEVITZ, 2001; LEVITZ, 2002) sendo que a fagocitose de *C. neoformans* não opsonizado pode ser facilitada pelo CD14 (LIPOVSKY et al., 1997; LEVITZ, 2002). A estimulação com GXM ativa a translocação do fator NF $\kappa$ B, sem que ocorra a ativação concomitante de MAP cinases (SHOHAM et al., 2001; LEVITZ, 2002). Esta via leva a uma não expressão de genes codificadores de moléculas pró-inflamatórias. Já as manoproteínas podem ser reconhecidas por receptores de manose e lectinas ligadoras de manose (MBL) em conjunção com moléculas CD14, sendo que anticorpos monoclonais anti-CD14 são capazes de inibir a produção de TNF- $\alpha$  induzida pela manoproteína-2 (CHAKA et al., 1997; LEVITZ, 2002).

O fato de não termos encontrado diferenças entre as variedades quanto à capacidade de indução da produção de TNF- $\alpha$  nos levou a indagar se estes resultados

não poderiam refletir um mecanismo de ação equivalente entre as manoproteínas das variedades *gattii* e *neoformans*, não cabendo também um papel preponderante, neste caso, para possíveis diferenças entre os GXMs. Todavia estas especulações ainda requerem muitos estudos comparativos visando esclarecer todas as vias de transdução de sinais estimuladas por moléculas presentes na cápsula das variedades do *C. neoformans*.

Muitos dos efeitos atribuídos ao TNF- $\alpha$  podem ser antagonizados pela citocina antiinflamatória, IL-10 (MOORE et al., 1993). Os resultados obtidos em nosso estudo mostram que tanto a estimulação de PBMCs quanto de leucócitos de sangue total *in vitro* com a variedade *gattii* são capazes de induzir à produção de níveis significativamente mais elevados de IL-10 ( $p < 0,05$ ) quando comparados a variedade *neoformans*. A IL-10 é uma citocina sintetizada por vários tipos celulares e que pode levar a uma modulação da resposta imune, inibindo a produção de citocinas próinflamatórias, induzindo a apoptose e reduzindo a capacidade de apresentação de antígenos, e também a produção de quimiocinas (STAPLES, BERGMANN, BARNES, NEWTON, 2000; KOGUCHI; KAWAKAMI, 2002; CHIAPELLO et al., 2004). Várias hipóteses podem ser levantadas para explicar a indução da produção de altos níveis de IL-10 pela variedade *gattii*. Foi descrito a produção de prostaglandina da série E pelo *C. neoformans* (NOVERR; PHARE; TOEWS; COFFEY; HUFFNAGLE, 2001) e sabe-se que as prostaglandinas induzem a um aumento na produção de IL-10 (DEMEURE et al., 1997). Poderíamos sugerir que a variedade *gattii* seja capaz de produzir níveis mais elevados de prostaglandinas do que a variedade *neoformans* e desta forma induzir indiretamente à produção de maiores quantidades de IL-10 pelas células do hospedeiro. Todavia esta explicação não se aplica aos nossos resultados porque trabalhamos com células de *C. neoformans* mortas pelo calor e, portanto incapazes de secretar mediadores solúveis como a PGE. Uma segunda causa provável para a indução de altos níveis de IL-10

podem ser os glicopolissacarídeos (GXM) encontrados em grande quantidade na cápsula do *C. neoformans*. Em ratos Wistar os GXM podem modificar a síntese de citocinas por células mononucleares, levando a produção de altos níveis de IL-10 e baixos de IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , afetar a maturação de células dendríticas (VECCHIARELLI et al., 2003) e induzir à apoptose celular (CHIAPELLO et al., 2004). Sabe-se que os GXM presentes na cápsula do *C. neoformans* afetam a produção de citocinas, induzindo a um aumento na produção de IL-10 e a perda do receptor de TNF- $\alpha$  da superfície de neutrófilos, reduzindo a migração de fagócitos para o local da infecção e a adesão de leucócitos às células do fungo; sendo este efeito mais pronunciado quando os camundongos eram infectados pela variedade *gattii* em comparação àqueles infectados pela variedade *neoformans* (DONG; MURPHY, 1995; DONG; MURPHY, 1996; MONARI et al., 2003). Sabe-se que o TLR2, o TNF- $\alpha$ , o IFN- $\gamma$  e a IL-12 são importante para a defesa contra a infecção pelo *C. neoformans*, mas não o TLR4 (BIONDO et al., 2005). Com os resultados obtidos neste estudo, poderíamos indagar se os GXMs da variedade *gattii* não estariam estimulando preferencialmente o TLR4, levando a uma produção de IL-10, sem produção de TNF- $\alpha$  através de uma ativação incompleta mediada pela translocação de NF $\kappa$ B, mas sem a ativação de MAP quinases. (SHOHAM; HUANG; CHEN; GOLENBOCK; LEVITZ, 2001). A resposta a esta pergunta requer novos estudos visando identificar quais são as vias de transdução de sinal preferencialmente ativadas pelas diferentes variedades de *C. neoformans*.

Diversos trabalhos descritos na literatura mostram que as prováveis conseqüências de uma elevação na produção de IL-10 incluem a redução na expressão de moléculas HLA de classe II e a apresentação de antígenos por macrófagos (RETINI; VECCHIARELLI; MONARI; BISTONI; KOZEL, 1998). Estes fenômenos, por sua vez, também levam à uma diminuição da proliferação celular e da secreção de citocinas

inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-12 entre outras, reduzindo por sua vez a produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio. Todos estes aspectos conduzem a uma inibição de resposta Th1, ficando o hospedeiro mais susceptível à infecção e facilitando o escape do *C. neoformans* (ELLERBROEK; ULFMAN; HOEPELMAN; COENJAERTS, 2004). Os dados obtidos neste trabalho sugerem que uma excessiva produção de IL-10 poderia levar ao desenvolvimento de uma infecção mais grave pela variedade *gattii* em relação à infecção pela variedade *neoformans*.

De todas as citocinas conhecidas, a IL-10 é, provavelmente, aquela que apresenta a mais potente ação anti-inflamatória sobre diversos aspectos da resposta imunológica do hospedeiro. Poderíamos levantar a hipótese de que os achados de maior virulência clínica previamente descritos na literatura para a variedade *gattii* devem ser explicados, pelo menos em parte, pela secreção de maiores quantidades de IL-10. A indução de uma “imunossupressão temporária” das células do hospedeiro seria um mecanismo de escape desenvolvido por esta variedade. Novos estudos sobre o “arranjo” ou “estrutura espacial” e densidade de expressão de GXMs, GalXMs e manoproteínas na cápsula das diferentes variedades podem ajudar a esclarecer os mecanismos envolvidos na maior produção de IL-10 induzida pela variedade *gattii* e detectada em nosso trabalho. Além disto, conforme citamos anteriormente, o estudo de receptores e vias de transdução de sinais que são especificamente ativadas ou inibidas pelos componentes da cápsula das diferentes variedades constitui-se em importante campo futuro de investigação.

Várias citocinas Th1 são importantes na resposta contra o *C. neoformans* tais como o IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$ , e IL-15 (DONG; MURPHY, 1995; KAWAKAMI; ZHANG; QURESHI; SAITO, 1997; QURESHI et al., 1999). De todas estas citocinas, o IFN- $\gamma$  parece exercer um papel central neste processo (ARORA et al., 2005; CHEN et al., 2005; SIDDIQUI et al., 2005). O IFN- $\gamma$  limita o crescimento do *C.*

*neoformans* em macrófagos e ainda pode ser utilizado em protocolos experimentais para tratamento e cura da criptococose disseminada *in vivo* (RAYHANE et al., 1999; SUMMERS; DORLING; BOYLE; SHAUNAK, 2005). Com relação ao IFN- $\gamma$ , nossos resultados mostraram uma produção extremamente reduzida desta citocina quando estimulamos PBMC ou leucócitos de sangue total, sendo observado um discreto aumento somente em sobrenadantes de PBMCs estimulados com a variedade *gattii* porém sem nenhuma significância estatística. Os dados obtidos sugerem que o *C. neoformans* parece não ser capaz de induzir *in vitro* à produção de grandes quantidades de IFN- $\gamma$ . Outra explicação possível é a de que o tempo de estimulação em cultura utilizado em nossos experimentos (18 horas) não tenha sido suficiente para induzir à produção de quantidades detectáveis de IFN- $\gamma$  por leucócitos estimulados pelo *C. neoformans*.

A imunidade celular é decisiva na defesa dos pacientes contra a infecção pelo o *C. neoformans*. (REARDON; KIM; WAGNER; KORNFELD, 1996; LINDELL; MOORE; MCDONALD; TOEWS; HUFFNAGLE, 2005). A resposta imune é realizada por células T ativadas e através da produção de citocinas, ativação de macrófagos, formação de granuloma, e destruição do fungo intracelular ou contido no estado de dormência. (DIAMOND; ROOT; BENNETT, 1972). Os principais mecanismos efetores da morte do *C. neoformans* envolvem a produção de óxido-nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ERO) (ROSSI et al., 1999, BARLUZZI et al., 2000; FELDMESSER; TUCKER; CASADEVALL, 2001; NICHOLS; BAUMAN; SCHAFER; MURPHY, 2002; FANG, 2004).

O *C. neoformans* pode desenvolver se intracelularmente, e o óxido nítrico é capaz de provocar a morte de microrganismos intracelulares. Dentro deste contexto o NO parece ser um fator importante no controle da infecção causada por este fungo. Não

detectamos em nossos experimentos, diferenças entre as variedades do *C. neoformans* com relação à produção de NO por PBMCs, Por outro lado, nossos resultados mostraram que quando leucócitos do sangue total foram estimulados com *C. neoformans* variedade *gattii* houve uma redução na produção de óxido nítrico em relação àqueles estimulados com a variedade *neoformans*, com diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). O *C. neoformans* é capaz de produzir mediadores, tais como as prostaglandinas (NOVER; PHARE; TOEWS; COFFEY; HUFFNAGLE, 2001), que poderiam afetar a produção de NO por leucócitos humanos. Também foi descrito que o *C. neoformans* é capaz de neutralizar o efeito do NO produzido por macrófagos sem interferir com a ação da enzima sintetizadora de óxido nítrico induzível (NOS2) provavelmente por consumo deste gás (TRAJKOVIC et al., 2000). Todavia, estes dados da literatura não explicam os resultados obtidos em nossos experimentos, pois utilizamos variedades de *C. neoformans* inativadas pelo calor. Uma explicação mais provável para os nossos resultados seria a inibição indireta da produção da NO pela ação da IL-10 induzida em maiores quantidades pela variedade *gattii*. Nossos dados sugerem que uma infecção pela variedade *neoformans* poderia resultar em uma resposta imune mais favorável para o hospedeiro com menor inibição da produção de óxido nítrico pelos granulócitos em comparação com o observado para a variedade *gattii*.

Avaliamos também a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) por granulócitos e observamos que aqueles estimulados com a variedade *gattii*, produziram menores quantidades totais de ERO em relação aos estimulados com a variedade *neoformans*. Estudos realizados por Huffnagle; Lipscomb, (1998); Cox et al., (2003); Narasipura; Ault; Behr; Chaturvedi; Chaturvedi, (2003) e Narasipura; Chaturvedi ; Chaturvedi, (2005) mostraram que o *C. neoformans* pode neutralizar os efeitos de

radicais livres de oxigênio produzidos pelos leucócitos do hospedeiro através da enzima superóxido dismutase presentes nas células do fungo (SOD). Outro mecanismo de escape descrito na literatura é a síntese de melanina pelo *C. neoformans* a partir de precursores como catecolaminas e dopamina encontrados no SNC (POLACHECK; PLATT; ARONOVITCH, 1990). A melanina e o manitol produzidos pelo fungo protegem contra o ataque oxidativo das células do hospedeiro, além de aumentar a síntese de citocinas Th2 (WANG; CASADEVALL, 1994; WANG; AISEN; CASADEVALL, 1995, CHATURVEDI; WONG; NEWMAN, 1996; MEDNICK; NOSANCHUK ; CASADEVALL, 2005). A partir dos dados obtidos em nosso trabalho, seria importante pesquisar se a variedade *gattii* é capaz de inibir mais eficientemente a atividade da NADPH oxidase em granulócitos humanos. A investigação dos mecanismos envolvidos neste processo deve contribuir para o conhecimento das estratégias de escape desta variedade do ataque imunológico do hospedeiro. Dentro deste contexto existem estudos mostrando que amostras de *C. neoformans* var. *gattii* que apresentam mutações na enzima SOD são mais susceptíveis ao ataque oxidativo de leucócitos do que as células de *C. neoformans* var. *gattii* com atividade normal de SOD (COX et al., 2003; NARASIPURA; AULT; BEHR; CHATURVEDI; CHATURVEDI, 2003; CHEN et al., 2005;). Outras investigações também necessitam ser realizadas em futuros projetos, tais como testar comparativamente a cinética de deposição de C3b e outras opsoninas entre às variedades de *gattii* e *neoformans*, o que também poderia explicar os resultados mostrando a produção de quantidades diferentes de ERO por granulócitos humanos expostos às duas variedades. Os dados obtidos em nosso estudo sugerem que uma menor produção de ERO *in vivo* poderia levar a uma infecção mais persistente pela variedade *gattii*, sendo este mais um aspecto envolvido na patogênese

do *C. neoformans* var. *gattii* e que o tornaria mais virulento que o *C. neoformans* var. *neoformans*.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a variedade *gattii* induz a uma produção de níveis mais elevados de IL-10, níveis reduzidos de óxido nítrico e menor produção de ERO por células do sistema imune em humanos em comparação com a variedade *neoformans*. Todos estes dados, associados ao fato que a IL-10 apresenta ações inibitórias sobre células do sistema imune e que NO e ERO são mediadores importantes da morte de *C. neoformans*, podem explicar, pelo menos em parte, a maior virulência previamente descrita para a variedade *gattii*.

**Conclusão**

De acordo com os nossos resultados a variedade que mais causou criptococose no Hospital Escola da UFTM no período de dezembro de 2001 a julho de 2005 foi a variedade *neoformans*.

Com relação à susceptibilidade aos antifúngicos, o estudo comparativo mostrou, em geral, um perfil equivalente com a maioria dos isolados de ambas as variedades sendo considerados sensíveis às drogas testadas. Também foram encontradas cepas resistentes e doses dependentes em ambas as variedades, com destaque para um isolado de *C. neoformans* var. *gattii* que apresentou CIMs elevadas para todos os quatros antifúngicos testados. Devido ao fato de termos detectados isolados dose dependentes e resistentes, concluímos que a realização de testes de susceptibilidade é necessária para avaliar a sensibilidade das cepas, visando uma terapia mais adequada aos pacientes.

Quanto à resposta imune encontramos níveis mais elevados de IL-10 e menor produção de NO e ERO pelas células estimuladas com a variedade *gattii* em comparação à variedade *neoformans* sugerindo que estes fatores podem conferir maior virulência ao *C. neoformans* var. *gattii*.

**Resumo**

A criptococose é uma micose cosmopolita que vem assumindo um papel relevante, principalmente em meningites. É considerada uma infecção oportunista, geralmente associada à imunodepressão e a pacientes acometidos de leucemia, câncer, diabetes, transplantados, em tratamento com corticosteróide ou infectados com o vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida, sendo menos freqüente, embora possível, em pacientes com imunidade normal. Apesar dos diversos avanços terapêuticos ainda é considerado difícil o tratamento da criptococose em indivíduos severamente imunossuprimidos, podendo chegar até 25% a mortalidade neste grupo, sendo que muito dos sobreviventes poderão apresentar seqüelas neurológicas permanentes.

O *Cryptococcus neoformans* é classificado em duas variedades, de acordo com os seus antígenos polissacarídeos capsulares, o *C. neoformans* variedade *neoformans* (sorotipos A, D e A/D) e o *C. neoformans* variedade *gattii* (sorotipos B e C). Importantes estudos epidemiológicos têm demonstrado diferenças geográficas na distribuição das variedades e existem relatos de maior dificuldade no tratamento com antifúngicos nas infecções por *C. neoformans* variedade *gattii*. O *C. neoformans* var. *gattii* é emergente como um patógeno primário, bioquímica e geneticamente diferente do *C. neoformans* var. *neoformans*. A variedade *gattii* difere da *neoformans* por ser capaz de causar doença em hospedeiros imunocompetentes. A infecção causada pelo *C. neoformans* var. *gattii* também é diferenciada da variedade *neoformans* devido o aumento na incidência de granulomas no pulmão e cérebro, aumentando a morbidade neurológica e ocorrendo baixa resposta a terapia com antifúngicos

A imunidade celular é decisiva na defesa dos pacientes contra a infecção pelo o *C. neoformans*. A gravidade da doença e o prognóstico na criptococose são dependentes,

em grande parte, da integridade do sistema imune do hospedeiro e das características próprias de cada variedade de *Cryptococcus neoformans*.

As diferenças no comportamento das variedades de *C. neoformans* ainda são muito pouco compreendidas e os trabalhos existentes enfocam principalmente a criptococose experimental. A resposta imune à variedade *gattii* é muito pouco conhecida e a maioria dos estudos restringe-se apenas ao estudo isolado da espécie *C. neoformans*. Existe, portanto, uma lacuna de conhecimento associado ao estudo comparativo da resposta imune às variedades do *C. neoformans*.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a susceptibilidade a antifúngicos e a resposta imune *in vitro* de leucócitos humanos frente às variedades de *C. neoformans*. Realizamos uma investigação comparativa *in vitro* de diversos parâmetros da resposta imunológica induzida pelas variedades do *C. neoformans* em células humanas. Os parâmetros investigados foram a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10), espécies reativas de oxigênio (ERO) e óxido-nítrico (NO).

De acordo com os nossos resultados a variedade que mais causou criptococose no Hospital Escola da UFTM no período de dezembro de 2001 a julho de 2005 foi a variedade *neoformans*. Com relação à susceptibilidade aos antifúngicos, o estudo comparativo mostrou, em geral, um perfil equivalente com a maioria dos isolados de ambas as variedades sendo considerados sensíveis às drogas testadas. Também foram encontradas cepas resistentes e doses dependentes em ambas as variedades, com destaque para um isolado de *C. neoformans* var. *gattii* que apresentou CIMs elevadas para todos os quatro antifúngicos testados. Devido ao fato de termos detectados isolados dose dependentes e resistentes, concluímos que a realização de testes de

susceptibilidade é necessária para avaliar a sensibilidade das cepas, visando uma terapia mais adequada aos pacientes.

Quanto à resposta imune encontramos níveis mais elevados de IL-10, níveis equivalentes de  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IFN}\gamma$  e menor produção de NO e ERO pelas células estimuladas com a variedade *gattii* em comparação à variedade *neoformans*. Todos estes dados, associados ao fato que a IL-10 apresenta ações inibitórias sobre células do sistema imune e que NO e ERO são mediadores importantes da morte de *C. neoformans*, podem explicar, pelo menos em parte, a maior virulência previamente descrita para a variedade *gattii*.

**Abstract**

Cryptococcosis is an opportunist infection generally associated to immunosuppressed states, such as leukemia, cancer, diabetes, organ transplantation or HIV infection, being less frequent, although possible, in patients with normal immunity. Treatment of cryptococcosis is considered difficult especially in immunosuppressed individuals, with a 25% mortality in this group, and much of the survivors will present permanent neurological sequelae.

*Cryptococcus neoformans* is classified in two varieties, in accordance with its antigens, the *C. neoformans* variety *neoformans* (serotype, A and D) and the *C. neoformans* variety *gattii* (serotype B and C). Important epidemiological studies have demonstrated geographic differences in the distribution of the varieties and also difficulties in the treatment of infections caused by *C. neoformans* variety *gattii*. The *gattii* variety is genetically and biochemically different from *neoformans* variety, being able to cause illness in immunocompetent hosts. The infection caused by the *C. neoformans* var. *gattii* is also differentiated from the *neoformans* variety by an increase in incidence of lung and brain granulomas and greater neurological morbidity with a poor response to antifungal drugs.

The cellular immune response is decisive in the defense of the patients against *C. neoformans* infection. The severity of infection depends, to a large extent, on the integrity of the host immune system and the specific characteristics of each *Cryptococcus neoformans* variety. Little is known about the immune response to the *gattii* variety and the majority of the papers are restricted to the *C. neoformans* species.

Based on these facts, we evaluated the antifungal susceptibility and *in vitro* immune response of human leukocytes to different *C. neoformans* varieties. The investigated parameters were the production of pro and anti-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-10), reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO).

Our results show that *neoformans* variety was the main cause of cryptococcosis in the Hospital Escola (UFTM) during the period of December 2001 to July 2005. With regard to the antifungal susceptibility, this comparative study showed a similar profile with the majority of isolated from both varieties being sensible to all tested drugs. Resistant and dose-dependent *C. neoformans* were also found in both varieties, with one isolated *gattii* variety presenting high CIMs for all the tested drugs. This fact led us to conclude that the execution of susceptibility tests are necessary to evaluate the sensitivity of *C. neoformans* varieties, in order to develop a better therapy program for infected patients.

Our data also shows higher IL-10 levels and lower production of NO and ROS by immune cells stimulated with the *gattii* variety in comparison to the *neoformans* variety. Due to the fact that IL-10 presents inhibitory actions on immune cells and NO and ROS are key mediators of *C. neoformans* killing, the data obtained in our study may explain, at least in part, the higher virulence previously described for the *gattii* variety.

## **Referências Bibliográficas**

ALLEN, R L ; STJERNHOLM, R C; STEEL, R H. Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 26., n. 47, p. 679–684, 1972

ALLER, A. I.; MARTIN-MAZUELOS, E.; LOZANO, F.; GOMEZ-MATEOS, J.; STEELE-MOORE, L.; HOLLOWAY, W. J. et al. Correlation of fluconazole MICs with clinical outcome in cryptococcal infection. **Antimicrob. Agents. Chemother.** v. 44, n. 6, p. 1544-1548, 2000.

ALMEIDA, G. M.; ANDRADE, R. M.; BENTO, C. A. The capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans* activate normal CD4(+) T cells in a dominant Th2 pattern. **J. Immunol.**, v. 167, n. 10, p. 5845-5851, 2001.

ALVES, S. H.; LOPES, J. O.; COSTA, J. M.; KLOCK, C. Development of secondary resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* isolated from a patient with AIDS. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 39, n. 6, p. 359-361, 1997.

ALVES, S. H.; OLIVEIRA, L. T.; COSTA, J. M.; LUBECK, I.; CASALI, A. K.; VAINSTEIN, M. H. In vitro susceptibility to antifungal agents of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in Southern of Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 43, n. 5, p. 267-270, 2001.

ANAISSIE, E.J.; BODEY, G.P.; RINALD, M.G. Emerging fungal pathogens. **Eur. J. Clin. Med. Microbiol. Infect. Dis.** v.8p.323-330, 1989.

ARORA, S.; HERNANDEZ, Y.; ERB-DOWNWARD, J. R.; MCDONALD, R. A.; TOEWS, G. B.; HUFFNAGLE, G. B. Role of IFN-gamma in regulating T2 immunity and the development of alternatively activated macrophages during allergic bronchopulmonary mycosis. **J. Immunol.**, v. 174, n. 10, p. 6346-6356, 2005.

BABIOR, M. B., KIPNES, R. S., CURNUTTE, J.T. Biological Defense Mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. **J Clin Invest.** v. 52, n. 3, p. 741–744, 1973

BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B. & MOSER, B. Human chemokine: An uptade. **Annu. Rev. Immunol.** v. 15, p. 675-675, 1997

BAKER, D. J.; REBOLI, A. C. Images in clinical medicine. Cutaneous cryptococcosis. **N. Engl. J. Med.**, v. 336, n. 14, p. 998, 1997.

BANERJEE, S.N.; EMORI, T.G.; CULVER, D.H.; GAYNES, R.P.; JARVIS, W.R.; HORAN, T.; EDWARDS, J.R.; TOLSON, J.; HENDERSON, T.; MARTONE, W.J. Secular trends in nosocomial primary blood stream infections in United States, 1980-1989. **Am. J. Med.** v.9, (suppl.3b), p.86-89, 1991

BARCHIESI, F.; COLOMBO, A.L.; MCGOUGH, D.A.; RINALDI, M.G. Comparative study of broth macrodilution and microdilution techniques for in vitro antifungal susceptibility testing of yeasts by using the National Committee for Clinical Laboratory Standards proposed standard. **J. Cli. Microbiol.** v.32, p. 2494-2500, 1994

BARLUZZI, R.; BROZZETTI, A.; MARIUCCI, G.; TANTUCCI, M.; NEGLIA, R. G.; BISTONI, F. et al. Establishment of protective immunity against cerebral cryptococcosis by means of an avirulent, non melanogenic *Cryptococcus neoformans* strain. **J.Neuroimmunol.**, v. 109, n. 2, p. 75-86, 2000.

BARONI, F. A.; PAULA, C. R.; SILVA, E. G.; VIANI, F. C.; RIVERA, I. N.; OLIVEIRA, M. T. et al. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro City, RJ, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 48, n. 2, p. 71-75, 2006.

BEENHOUWER, D. O.; SHAPIRO, S.; FELDMESSER, M.; CASADEVALL, A.;SCHARFF, M. D. Both Th1 and Th2 cytokines affect the ability of monoclonal antibodies to protect mice against *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.** v. 69, n. 10, p. 6445-6455, 2001.

BEYT, B. E. Jr.; WALTMAN, S. R. Cryptococcal endophthalmitis after corneal transplantation **New. Engl. Med.** v. 298, n. 15, p. 825-826, 1978

BICALHO, H.M.S.; GONTIJO, C.M.; & MACHADO NOGUEIRA, J. A. A Simple Technique For Simultaneous Human Leukocytes Separation. **J. Immunol. Methods.** v.10, p.115-116, 1981.

BIER, O. **Bacteriologia e imunologia.** São Paulo: Melhoramentos, 1980.

BIONDO, C.; MIDIRI, A.; MESSINA, L.; TOMASELLO, F.; GARUFI, G.; CATANIA, M. R. et al. MyD88 and TLR2, but not TLR4, are required for host defense against *Cryptococcus neoformans*. **Eur. J. Immunol.**, v. 35, n. 3, p. 870-878, 2005.

BLACKSTOCK, R. ; MURPHY, J. W. Age-related resistance of C57BL/6 mice to *Cryptococcus neoformans* is dependent on maturation of NKT cells. **Infect. Immun.** v. 72, n. 9, p. 5175-5180, 2004.

BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; DIAZ, M.; FELL, J. W.; HOP, W. C.; ABELN, E. C. et al. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology.** v. 147, n. Pt 4, p. 891-907, 2001.

BRAMMER, K.W.; FARROW, P.R.; FAUKKER, J.K. Pharmacokinetics and tissue penetration of fluconazole in humans. **Rev. Infect. Dis.** v.12, p. 318-326, 1990.

BRANCHINI, M.L.; DELGADO, A. C. N.; VILLARES, M. C. B. Caracterização das variedades e sorotipos de *Cryptococcus neoformans* de pacientes internados no Hospital das Clínicas da Unicamp. **J. Brás. de Patol.** v. 36: p. 13, 2000.

BRANDÃO, A. F. M.; LIMA, A. S.; RODRIGUES, A. B. N.; LOBATO, F. JSANTOS, I.; COELHO, M. S.; SOUSA, R. C. S. Meningoencefalite criptocócica: estudo clínico-epidemiológico de 59 pacientes. *Net.Disponível*<<http://www.maymone.com.br/espaco>>. Acesso em: 18 abr. 2004

BUENTKE, E.; SCHEYNIUS, A. Dendritic cells and fungi. **APMIS**, v. 111, n. 7-8, p. 789-796, 2003.

BUSSE, O. Uber parasitare zelleinschlusse und ihre zuchtung. **Zentralbl. Bakteriol.** v. 16, p. 175-180, 1894.

CALHOUN, D.L.; ROBERTS, G.D.; JORGENSEN, J. Results of survey of antifungal susceptibility tests in the United States and interlaboratory comparison of broth dilution testing of flucytosine and Anphotericin B. **J. Clin. Microbiol.** v.23, p.298-301, 1986.

CASADEVALL, A.; CASSONE, A.; BISTONI, F.; CUTLER, J. E.; MAGLIANI, W.; MURPHY, J. W. et al. Antibody and/or cell-mediated immunity, protective mechanisms in fungal disease: an ongoing dilemma or an unnecessary dispute? **Med. Mycol.**, v. 36 Suppl 1, p. 95-105, 1998.

CASALI, A. K.; GOULART, L.; ROSA E SILVA LK; RIBEIRO, A. M.; AMARAL, A. A.; ALVES, S. H. et al. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **FEMS Yeast. Res.** v. 3, n. 4, p. 405-415, 2003.

CHAKA, W.; HEYDERMAN, R.; GANGAIDZO, I.; ROBERTSON, V.; MASON, P.; VERHOEF, J. Cytokine profiles in cerebrospinal fluid of human immunodeficiency virus-infected patients with cryptococcal meningitis: no leukocytosis despite high interleukin-8 levels. University of Zimbabwe Meningitis Group. **J. Infect. Dis.**, v. 176, n. 6, p. 1633-1636, 1997.

CHAKA, W.; VERHEUL, A. F.; VAISHNAV, V. V.; CHERNIAK, R.; SCHARRINGA, J.; VERHOEF, J. Induction of TNF-alpha in human peripheral blood mononuclear cells by the mannoprotein of *Cryptococcus neoformans* involves human mannose binding protein. **J. Immunol.**, v. 159, n. 6, p. 2979-2985, 1997.

CHATURVEDI, V.; WONG, B.; NEWMAN, S. L. Oxidative killing of *Cryptococcus neoformans* by human neutrophils. Evidence that fungal mannitol protects by

scavenging reactive oxygen intermediates. **J. Immunol.**, v. 156, n. 10, p. 3836-3840, 1996.

CHAVES, M. M., ROCHA-VIEIRA, E. LIMA E SILVA, R. REIS, A.P., NOGUEIRA-MACHADO, JA Host defenses in the aged: evaluation of the balance between oxidizing species generation and reducing power in phagocytosing human granulocytes. **Mechanisms of Ageing and Development.** v. 104, n. 1., p. 103-109, 1998.

CHEN, G. H.; MCDONALD, R. A.; WELLS, J. C.; HUFFNAGLE, G. B.; LUKACS, N. W.; TOEWS, G. B. The gamma interferon receptor is required for the protective pulmonary inflammatory response to *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 3, p. 1788-1796, 2005.

CHENSUE, S. W., WARMINGTON, K.S. RUTH, J.H., SANGHI, P.S., LINCOLN, P., & KUNKEL, S.L. Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in Th1 (mycobacterial) and Th2 (schistosomal) antigen-induced granuloma formation: relationship to local inflammation, the cell expression, and IL-12 production. **J. Immunol**, v. 157, p. 4602-4608, 1996.

CHENSUE, S.W., RUTH, J.H., WARMINGTON, K., LINCOLN, P., KUNKEL S.L. *In vivo* regulation of macrophage IL-12 production during type 1 and type 2 cytokine-mediated granuloma formation. **J. Immunol.** v. 155, p. 3546-3551, 1995.

CHIAPELLO, L. S.; BARONETTI, J. L.; AOKI, M. P.; GEA, S.; RUBINSTEIN, H.; MASI, D. T. Immunosuppression, interleukin-10 synthesis and apoptosis are induced in rats inoculated with *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan. **Immunology**, v. 113, n. 3, p. 392-400, 2004.

CHRISTENSEN, W.B. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and *Paracolon* cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. **J. Bacteriol.** v.52,p. 461-466, 1946.

CHUCK, S. L. ; SANDE, M. A. Infections with *Cryptococcus neoformans* in the acquired immunodeficiency syndrome. **N. Engl. J. Med.**, v. 321, n. 12, p. 794-799, 1989.

CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A. Comparison of fungizone, Amphotec, AmBisome, and Abelcet for treatment of systemic murine cryptococcosis. **Antimicrob. Agents. Chemother.** v. 42, n. 4, p. 899-902, 1998.

COCCHI F.; DE VICO A. L., GARZINO-DEMO A., ARYA., GALLO R. C. & LUSSO P. RANTES, MP-1  $\alpha$  in HIV. **Science.** v. 270, p. 1811-1815, 1995.

COLOMBO, A. L.; BARCHIESI, F.; MCGOUGH, D. A.; RINALDI, M. G. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 3, p. 535-540, 1995.

CORRÊA, M. P. S.; OLIVEIRA, E. C.; DUARTE, R. R. B. S.; PARDAL, P. P.O.; OLIVEIRA, F. M.; SEVERO, L. C. Criptococose em crianças no Estado do Pará, Brasil. **Rev. da Soc. Brás. de Med Trop.** v.32; p. 505- 508, 1999.

COTRAN, KUMAR. & ROBBINS: Robbins **Pathologic Basis of Disease.** 5th ed. USA: Philadelphia, 1994.

COX, G. M.; HARRISON, T. S.; MCDADE, H. C.; TABORDA, C. P.; HEINRICH, G.; CASADEVALL, A. Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 1, p. 173-180, 2003.

DAVEL, G.; ABRANTES, R.; BRUDNY, M.; CORDOBA, S.; RODERO, L.; CANTEROS, C. E. [1st environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Argentina]. **Rev. Argent. Microbiol.**, v. 35, n. 2, p. 110-112, 2003.

DE BEDOULT, C.; ORDÓNEZ, N.; GÓMEZ, B.; L.; RODRIGUES, M.; C.; ARANGO, M.; RESTREPO, A.; CASTANEDA, E. In vitro antifungal susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and *neoformans* var. *gattii*. **Rev. Iberoan. Micol.** v.16, p. 36-39, 1999.

DEMEURE, C. E.; YANG, L. P.; DESJARDINS, C.; RAYNAULD, P.; DELESPESE, G. Prostaglandin E2 primes naive T cells for the production of anti-inflammatory cytokines. **Eur J Immunol.** v. 27. n. 12., p. 3526–3531, 1997.

DEL POETA, M. Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot.Cell**, v. 3, n. 5, p. 1067-1075, 2004.

DELFINO, V.D.A.; MATNI, A.M.; GORDAN, P.A. Micoses profundas em transplantados renais: indicação de aleta clínico. **J. Bras. Nefrol.** V.16, n.3, p. 143-148, 1994.

DERESINSKI, S. C.; LILLY, R. B.; LEVINE, H. B.; GALGIANI, J. N.; STEVENS, D. A. Treatment of fungal meningitis with miconazole. **Arch. Intern. Med.**, v. 137, n. 9, p. 1180-1185, 1977.

DIAMOND, R. D.; ROOT, R. K.; BENNETT, J. E. Factors influencing killing of *Cryptococcus neoformans* by human leukocytes in vitro. **J. Infect. Dis.**, v. 125, n. 4, p. 367-376, 1972.

DIAMOND, R.D. ; BENNETT, J.E. Growth of *Cryptococcus* within human macrophages in vitro. **Infect. Immun.** p. 231-235, 1973

DIAZ, M. R.; BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; FELL, J. W. Molecular sequence analyses of the intergenic spacer (IGS) associated with rDNA of the two varieties of the pathogenic yeast, *Cryptococcus neoformans*. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 23, n. 4, p. 535-545, 2000.

DONG, Z. M.; MURPHY, J. W. Effects of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* cells and culture filtrate antigens on neutrophil locomotion. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 7, p. 2632-2644, 1995.

DONG, Z. M. ; MURPHY, J. W. Cryptococcal polysaccharides induce L-selectin shedding and tumor necrosis factor receptor loss from the surface of human neutrophils. **J.Clin.Invest**, v. 97, n. 3, p. 689-698, 1996.

DROMER, F.; MATHOULIN, S.; DUPONT, B.; LAPORTE, A. Epidemiology of cryptococcosis in France: a 9 year survey (1985-1993). French Cryptococcosis Study Group. **Clin. Infect. Dis.** v.23, n.1, p.82-90, 1996.

DROUHET, E. Milestones in the history of *Cryptococcus neoformans*. **J. Mycol. Med.** v.7, p. 10-27, 1997.

ELLERBROEK, P. M.; ULFMAN, L. H.; HOEPELMAN, A. I.; COENJAERTS, F. E.J. Cryptococcal glucuronoxylomannan interferes with neutrophil rolling on the endothelium. **Cell. Microbiol.** v. 6, n. 6, p. 581-592, 2004.

ELLERBROEK, P. M.; WALENKAMP, A. M.; HOEPELMAN, A. I.; COENJAERTS, F. E. Effects of the capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans* on phagocyte migration and inflammatory mediators. **Curr. Med. Chem.**, v. 11, n. 2, p. 253-266, 2004.

ELLIS, D. H. ; PFEIFFER, T. J. Ecology, life cycle, and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. **Lancet.** v. 336, n. 8720, p. 923-925, 1990.

ESPINEL-INGROFF, A.; STOCKMAN, L.; ROBERTS, G.; PINCUS, D.; POLLACK, J.; MARLER, J. Comparison of RapID yeast plus system with API 20C system for identification of common, new, and emerging yeast pathogens. **J. Clin. Microbiol.** v. 36, n. 4, p. 883-886, 1998.

FANG, F.C. Antimicrobial Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Concepts and Controversies. **Nature reviews.** v. 2, p. 820-832, 2004.

FELDMESSER, M.; KRESS, Y.; CASADEVALL, A. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. **Microbiology.** v. 147, n. Pt 8, p. 2355-2365, 2001.

FELDMESSER, M.; TUCKER, S.; CASADEVALL, A. Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. **Trends Microbiol.**, v. 9, n. 6, p. 273-278, 2001.

FERNANDES, O. F.; COSTA, T. R.; COSTA, M. R.; SOARES, A. J.; PEREIRA, A. J. SILVA, M. R. [*Cryptococcus neoformans* isolated from patients with AIDS]. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 33, n. 1, p. 75-78, 2000.

FERNANDES, O.F.L.; PASSOS X.S.; SOUZA, L.K.; MIRANDA A.T.; CERQUEIRA, C.H.; SILVA, M.R. In vitro susceptibility Characteristics of *Cryptococcus neoformans* varieties from AIDS patients in Goiania. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 98, n. 6, p. 839-841, 2003.

FERNÁNDEZ-BOTRAN, R.; SANDERS, V.M.; MOSMANN, T.R.; VITETTA, E.S. Lymphokine-mediated regulation of the proliferative response of clones of T helper and T helper 2 cells. **J. Exp. Med.** v. 168, p. 543-558, 1988

FERRINI M, WANG C, SWERDLOFF RS, SINHA HIKIM AP, RAJFER J, GONZALEZ-CADAVID N.F. Aging-Related Increased Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase and Cytotoxicity Markers in Rat Hypothalamic Regions Associated with Male Reproductive Function. **Neuroendocrinology.** v.74, p.1-11, 2001.

FIORENTINO, D.F., ZLOTNIK, T.R., HOWARD, M., O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by ACTIVATED MACROPHAGES. **J. Immunol** , v. 137, p. 3815-3822, 1991.

FIRESTEIN, G.S.; ROEDER, W.D.; MOSMANN, T.R.; Two types of mouse T helper cell Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by th1 clones. **J. Exp. Med.** v. 170, p. 518-525, 1989.

FISHER, D.; BURROW, J.; LO, D.; CURRIE, B. *Cryptococcus neoformans* in tropical northern Australia: predominantly variant gattii with good outcomes. **Aust. N. Z. J. Med.**, v. 23, n. 6, p. 678-682, 1993.

FOLLIN, P.; DAHLGREN, C. Phagocytosis by lipopolysaccharide-primed human neutrophils is associated with increased extracellular release of reactive oxygen metabolites. **Inflammation.** v. 16., p. 83-91, 1992

FORSTERMANN, U.; KLEINERT, H.; GATH, I.; SCHWARZ, P.; CLOSS, E.; E; DUN, N. Expression and expressional control of nitric oxide synthases in various cell types. **Adv. Pharmacol.** v. 34, p. 171-185, 1995.

FRANZOT, S. P.; HAMDAN, J. S. In vitro susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* to five antifungal drugs. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 40, n. 3, p. 822-824, 1996.

FRANZOT, S. P.; HAMDAN, J. S.; CURRIE, B. P.; CASADEVALL, A. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Brazil and the United States: evidence for both local genetic differences and a global clonal population structure. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 9, p. 2243-2251, 1997.

FRANZOT, S. P.; SALKIN, I. F.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 3, p. 838-840, 1999.

FROMTLING, R. A.; SHADOMY, H. J.; JACOBSON, E. S. Decreased virulence in stable, acapsular mutants of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, v. 79, n. 1, p. 23-29, 1982.

FROMTLING, R.A.; BULMER G. S: Distribution of *Cryptococcus neoformans* in a natural site. **Infect. Immun.** v. 31, p. 560-563, 1981

GAJEWSKI.T.F. & FITCH, F.W. Anti-proliferative effect of IFN- $\gamma$  inhibits the – proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. **J. Immunol.** v. 140, p. 4245-4252, 1998.

GLASER J. B.; GARDEN A. Inoculation of cryptococcosis without transmission of the acquired immunodeficiency syndrome. **New. Engl J Med.**, v. 313, n. 4, p. 26-36, 1985.

GOLD, W. Amphotericin A and B: Antifungal antibiotics produced by a *streptomyces*. In vitro studies of a antibiotics annual, 1955-1956, **Medical. Encyclopedia.** p. 579-586, 1956.

GOLDMAN, D. L.; CASADEVALL, A.; CHO, Y.; LEE, S. C. *Cryptococcus neoformans* meningitis in the rat. **Lab. Invest.**, v. 75, n. 6, p. 759-770, 1996.

GOLDMAN, D.; SONG, X.; KITAI, R.; CASADEVALL, A.; ZHAO, M. L.; LEE, S. C. *Cryptococcus neoformans* induces macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha) and MIP-1beta in human microglia: role of specific antibody and soluble capsular polysaccharide. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 3, p. 1808-1815, 2001.

GRAYBILL, J. R.; MITCHELL, L.; LEVINE, H. B. Treatment of experimental murine cryptococcosis: a comparison of miconazole and amphotericin B. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 13, n. 2, p. 277-283, 1978.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J., SKIPPER, P.L. Wishnok J S, Tannenbaum S R. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.** v. 126., n. 1., p. 131-138, 1982

HAMILTON, A. J.; BARTHOLOMEW, M. A.; FIGUEROA, J.; FENELON, L. E.; HAY, R. J. Production of species-specific murine monoclonal antibodies against *Cryptococcus neoformans* which recognize a noncapsular exoantigen. **J. Clin. Microbiol.** v. 29, n. 5, p. 980-984, 1991.

HARRISON, T. S.; LEVITZ, S. M. Mechanisms of impaired anticryptococcal activity of monocytes from donors infected with human immunodeficiency virus. **J. Infect. Dis.**, v. 176, n. 2, p. 537-540, 1997.

HARRISON, T. S.; NONG, S.; LEVITZ, S. M. Induction of human immunodeficiency virus type 1 expression in monocytic cells by *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. **J. Infect. Dis.**, v. 176, n. 2, p. 485-491, 1997.

HAZEN, E.; BROWN, R. Two antifungal agents produced by a soil actinomyces. **Science**, v.112, p.423,1950.

HE, W.; CASADEVALL, A.; LEE, S. C.; GOLDMAN, D. L. Phagocytic activity and monocyte chemotactic protein expression by pulmonary macrophages in persistent pulmonary cryptococcosis. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 2, p. 930-936, 2003.

HEITMAN, J.; ALLEN, B.; ALSPAUGH, J. A.; KWON-CHUNG, K. J. On the origins of congenic MAT $\alpha$  and MAT $\alpha$  strains of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Fungal. Genet. Biol.**, v. 28, n. 1, p. 1-5, 1999.

HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 3.ed. São Paulo: Manole, 1999. 1550 páginas.

HERNÁNDEZ, E.A.; PAZ, V.C.; FERNÁNDEZ-TERÁN, M.L.P. Micosis oportunistas invasivas em el sida. Um estudo de 211 autopsias. **Rev. Iberoan. Micol.** v. 15, p. 33-35, 1998.

HERRING, A. C.; FALKOWSKI, N. R.; CHEN, G. H.; MCDONALD, R. A.; TOEWS, G. B.; HUFFNAGLE, G. B. Transient neutralization of tumor necrosis factor alpha can produce a chronic fungal infection in an immunocompetent host: potential role of immature dendritic cells. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 1, p. 39-49, 2005.

HIBBS, J.J.; TANTON, R.; VANVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role L- arginina deaminase activity and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science**. v. 235, p. 473-476, 1987

HIRANO, M.; MATSUI T. In: "Cellular Chemiluminescence". **K. Van Dyke, C. Castranova** ed. CRC press. Boca Raton, Florida, 1986.

HOAG, K. A.; STREET, N. E.; HUFFNAGLE, G. B.; LIPSCOMB, M. F. Early cytokine production in pulmonary *Cryptococcus neoformans* infections distinguishes susceptible and resistant mice. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v. 13, n. 4, p. 487-495, 1995.

HOESLEY, C.; DISMUKES, W.E. Overview of oral azole drugs as systemic antifungal therapy. **Semin. Resp. Crit. Care. Med.** v. 18, p. 301-309, 1997.

HORTA, J. A.; STAATS, C. C.; CASALI, A. K.; RIBEIRO, A. M.; SCHRANK, I. S.; SCHRANK, A. Epidemiological aspects of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **Med. Mycol.**, v. 40, n. 6, p. 565-571, 2002.

HUANG, C. ; LEVITZ, S. M. Stimulation of macrophage inflammatory protein-1alpha, macrophage inflammatory protein-1beta, and RANTES by *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* in peripheral blood mononuclear cells from persons with and without human immunodeficiency virus infection. **J. Infect. Dis.**, v. 181, n. 2, p. 791-794, 2000.

HUFFNAGLE, G. B.; LIPSCOMB, M. F. Cells and cytokines in pulmonary cryptococcosis. **Res. Immunol.**, v. 149, n. 4-5, p. 387-396, 1998.

HUFFNAGLE, G. B.; MCNEIL, L. K. Dissemination of *C. neoformans* to the central nervous system: role of chemokines, Th1 immunity and leukocyte recruitment. **J. Neurovirol.**, v. 5, n. 1, p. 76-81, 1999.

HUFFNAGLE, G. B.; MCNEIL, L. K.; MCDONALD, R. A.; MURPHY, J. W.; TOEWS, G. B.; MAEDA, N. et al. Cutting edge: Role of C-C chemokine receptor 5 in organ-specific and innate immunity to *Cryptococcus neoformans*. **J. Immunol.**, v. 163, n. 9, p. 4642-4646, 1999.

JANBON, G. *Cryptococcus neoformans* capsule biosynthesis and regulation. **FEMS. Yeast. Res.**, v. 4, n. 8, p. 765-771, 2004.

KAPPER, R.; LEVITZ, S.; HARRISON, T.; S.; RUHNKE, M.; AMPEL, N.; M.; JUSTNOBLING, G. Recent advances in cryptococcosis, candidiasis and coccidioidomycosis complicating HIV infection. **Med. Mycol.** v.36 (suppl 1), p.207-215, 1998.

KAUFFMAN, C.A. CARVER, P.L. Use of azoles for systemic antifungal therapy **Advan. Pharmacol.** v. 39, p.143-189,1997.

KAVANAUGH, L. A.; FRASER, J. A.;DIETRICH, F. S. Recent Evolution of the Human Pathogen *Cryptococcus neoformans* by Inter-Varietal Transfer of a 14 Gene Fragment. **Mol. Biol. Evol.**, 2006.

KAWAKAMI, K.; SHIBUYA, K.; QURESHI, M. H.; ZHANG, T.; KOGUCHI, Y.; TOHYAMA, M. Chemokine responses and accumulation of inflammatory cells in the lungs of mice infected with highly virulent *Cryptococcus neoformans*: effects of interleukin-12. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** v. 25, n. 4, p. 391-402, 1999.

KAWAKAMI, K.; ZHANG, T.; QURESHI, M. H.;SAITO, A. *Cryptococcus neoformans* inhibits nitric oxide production by murine peritoneal macrophages stimulated with interferon-gamma and lipopolysaccharide. **Cell Immunol.** v. 180, n. 1, p. 47-54, 1997.

KEILIN D. & HARTREE, E. F. Reaction of nitric oxide with hemoglobin and metahemoglobin. **Nature.** v. 548, p. 1937-1945, 1937.

KIMURA, M.; KAUFMAN, L.; MAEKURA, S.; TERAMURA, K.; SATOU, T.;HASHIMOTO, S. Pulmonary cryptococcosis due to a capsule-deficient strain confused with metastatic lung cancer. **Mycopathologia.** v. 140, n. 2, p. 65-68, 1997.

KINSKY, S.C. Antibiotic interations wich modal membranes. **Ann. Rev. Pharmacol.** v.10, p.119, 1970.

KLEBANOFF, S. J. Antimicrobial mechanisms in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes **Semin Hematol.** v.12., n. 2., p. 117–142, 1975

KLEBANOFF, S. J. Iodination of bacteria: a bactericidal mechanism. **J Exp Med.** v. 126., n. 6., p. 1063–1078, 1967

KLIS, F.M.; MOL, P.; HELLINGWERF, K.; BRAL, S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol.** v. 6, 239-256, 2002.

KOGUCHI, Y.; KAWAKAMI, K. Cryptococcal infection and Th1-Th2 cytokine balance. **Int. Rev. Immunol.**, v. 21, n. 4-5, p. 423-438, 2002.

KOZEL, T. R.; GOTSCHLICH, E. C. The capsule of *Cryptococcus neoformans* passively inhibits phagocytosis of the yeast by macrophages. **J. Immunol.**, v. 129, n. 4, p. 1675-1680, 1982.

KOZEL, T. R. Activation of the complement system by the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Curr.Top.Med.Mycol.**, v. 5, p. 1-26, 1993.

KRINSKY, N. I. Singlet excited oxygen as a mediator of the antibacterial action of leukocytes. **Science**. v. 25, n. 186, p. 363–365, 1974

KULLBERG, M.C.; PEARCE, E.J.; HIENY, S.E.; SHER, A.; BERZOFISKY, J.A. Infection with *Schistosoma mansoni* alters Th1/Th2 cytokine response to a non-parasite antigen. **J. Immunol.** v. 148, p.3264-3270, 1992.

KUNKEL, S.L., LUKACS, N.W. & STRIETER R. M. chemokines and their role in human disease. **Agents Actions.** , v. 46, p. 11- 17, 1995.

KWAN, L.C.; MEDOFF, G.; COBAYASHI, S. Protentation of the antifungal effects to antibiotics by amphotericin B. **Antimicrob Ag. Chemother.** v.2, p. 61,1972

KWON-CHUNG KJ. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. **Mycologia.** v. 68 p.942-946, 1976.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHEK, I.;BENNETT, J. E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). **J. Clin. Microbiol.**, v. 15, n. 3, p. 535-537, 1982.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Am. J .Epidemiol.**, v. 120, n. 1, p. 123-130, 1984.

KWON-CHUNG, K. J.; RHODES, J. C. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 51, n. 1, p. 218-223, 1986.

KWON-CHUNG, K. J.; SORRELL, T. C.; DROMER, F.; FUNG, E.;LEVITZ, S.M. Cryptococcosis: clinical and biological aspects. **Med. Mycol.**, v. 38 Suppl 1, p. 205-213, 2000.

LACAZ, C. S.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T.; MORENO-CARVALHO, O. A.; SAMPAIO, M. L.; NOGUEIRA, L. S. [Neurocryptococcosis caused by nonencapsulated *Cryptococcus neoformans*]. **Arq Neuropsiquiatr.**, v. 51, n. 3, p. 395-398, 1993.

LACAZ, C.S.; DEL NEGRO, **Drogas antifúngicas; terapêutica das micoses.** In. SILVA P. Farmacologia. 4, ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994, p.1156-1190.

LACAZ, C.S; et al. **Tratado de Micologia Medica.** LACAZ. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002, 1104p.

LAERTE, V. P. J Resumo. In: Criptococose associada à Aids. Análise da casuística do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, **Fiocruz** entre 1987 e 2002. Dissertação (mestrado em Medicina tropical). Instituto Oswaldo Cruz. 2003.

LARSEN, R. A.; BAUER, M.; THOMAS, A. M.; SANCHEZ, A.; CITRON, D.; RATHBUN, M. Correspondence of in vitro and in vivo fluconazole dose-response curves for *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, n. 8, p. 3297-3301, 2005.

LETTERIO J.J. & ROBERTS A.B. Regulation of immune responses by TGE- $\beta$ . **Annu. Rev. Immunol.** v. 16, p. 137-161, 1998.

LEVITZ, S. M. Receptor-mediated recognition of *Cryptococcus neoformans*. **Nippon Ishinkin.Gakkai Zasshi**, v. 43, n. 3, p. 133-136, 2002.

LICEA, B. A.; GARZA, D. G.; URBIETA, V. F.; OLIVARES, R. A. C. Islamiento y caracterización de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* a partir de muestras de *Eucalyptus camaldulensis* en la ciudad de México. **Rev. Iber. de Micol.** v.16, p.40-42, 1999.

LIFSON, A. R.; RHAME, F. S.; BELLOSO, W. H.; DRAGSTED, U. B.; EL-SADR, W. M.; GATELL, J. M. Reporting and Evaluation of HIV-Related Clinical Endpoints in Two Multicenter International Clinical Trials. **HIV.Clin.Trials**, v. 7, n. 3, p. 125-141, 2006.

LINDELL, D. M.; MOORE, T. A.; MCDONALD, R. A.; TOEWS, G. B.; HUFFNAGLE, G. B. Generation of antifungal effector CD8<sup>+</sup> T cells in the absence of CD4<sup>+</sup> T cells during *Cryptococcus neoformans* infection. **J. Immunol.**, v. 174, n. 12, p. 7920-7928, 2005.

LIPOVSKY, M. M.; GEKKER, G.; ANDERSON, W. R.; MOLITOR, T. W.; PETERSON, P. K.; HOEPELMAN, A. I. Phagocytosis of nonopsonized *Cryptococcus neoformans* by swine microglia involves CD14 receptors. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 84, n. 2, p. 208-211, 1997.

LIPOVSKY, M. M.; GEKKER, G.; HU, S.; EHRlich, L. C.; HOEPELMAN, A. I.; PETERSON, P. K. Cryptococcal glucuronoxylomannan induces interleukin (IL)-8 production by human microglia but inhibits neutrophil migration toward IL-8. **J. Infect. Dis.** v. 177, n. 1, p. 260-263, 1998.

LOZANO-CHIU, M.; PAETZNICK, V. L.; GHANNOUM, M. A.; REX, J. H. Detection of resistance to amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* clinical isolates: performances of three different media assessed by using E-test and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A methodologies. **J.Clin.Microbiol.**, v. 36, n. 10, p. 2817-2822, 1998.

LU, T. H.; CHANG, H. J.; CHEN, L. S.; CHU, M. H.; OU, N. M.; JEN, I. Changes in causes of death and associated conditions among persons with HIV/AIDS after the introduction of highly active antiretroviral therapy in Taiwan. **J. Formos. Med. Assoc.**, v. 105, n. 7, p. 604-609, 2006.

LUBERTO, C.; MARTINEZ-MARINO, B.; TARASKIEWICZ, D.; BOLANOS, B.; CHITANO, P.; TOFFALETTI, D. L. et al. Identification of App1 as a regulator of phagocytosis and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Invest**, v. 112, n. 7, p. 1080-1094, 2003.

LUKACS, N.W., CHENSUE, S.W., STRIETER, R.M., WARMINGTON, K., KUNKEL, S.L. Inflammatory granuloma formation is mediated by TNF- $\alpha$ -inducible intercellular adhesion molecule -1. **J. Immunol.** v. 152, p. 5883-5889, 1994.

LUKACS, N.W.; KUNKEL, S.L., STRIETER R. M; WARMINGTON, K., CHENSUE, S.W. The role of macrophage inflammatory protein 1 alpha in *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous inflammation.. **J. Exp. Med.** v. 177, p. 1551-1559, 1993.

LUKACS, N.W.; STRIETER, R.M.; SHAKLEE, C.L. CHENSUE, S.W. & KUNKEL, S.L. Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ . Influences eosinophil recruitment in antigen-specific-air-way inflammation. **Eur. J. Immunol.** v. 25, p. 245-254, 1995.

LUTZ, J. E.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A. Enhancement of antifungal chemotherapy by interferon-gamma in experimental systemic cryptococcosis. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 46, n. 3, p. 437-442, 2000.

LYONS, C.R. The role of nitric oxide in inflammation. **Adv. Immunol.** v. 60, p. 323-327, 1995.

MARIANO, A. R.; MONTEIRO, A. G.; ALEXANDRE, D. G.; VES MELO, B. C. Glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans* exacerbates in vitro yeast cell growth by interleukin 10-dependent inhibition of CD4<sup>+</sup> T lymphocyte responses. **Cell Immunol.**, v. 222, n. 2, p. 116-125, 2003.

MAZA, L. M. de la; PEZZLO, M. T.; BARON, E. J. **Atlas de diagnóstico em microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 1999, 216p.

MEDNICK, A. J.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* affects lung inflammatory responses during cryptococcal infection. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 4, p. 2012-2019, 2005.

MEDOFF, G.; KOBAYASHI, G. S.; KWAN, C. N.; SCHLESSINGER, D.; VENKOV, P. Potentiation of rifampicin and 5-fluorocytosine as antifungal antibiotics by

amphotericin B (yeast-membrane permeability-ribosomal RNA-eukaryotic cell-synergism). **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 69, n. 1, p. 196-199, 1972.

MENTZ, J. P.; RODRIGUEZ, R.; CABRERA, G.; MENTZ, L. M.; MENTZ, M.; GRAZZIOTIN, R. Z. Criptococose Cutânea Primária Mimetizando Carcinoma Basocelular - Relato de Caso. 2001. *Net.* Disponível em: <http://www.medstudents.com.br/original/relato/criptoco/criptoco.htm>. Acesso em: 27 abr. 2004.

MILLER, M.J.S. & GRISHAM, M. B. Nitric oxide as a mediator of inflammation? You had better believe it. *Med. Inflamm.* v. 4, p. 387-396, 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia Brasileiro de Vigilância Epidemiológica 1998 *Net.* disponível em: <http://www.saudeemmovimento.com.br>. Acesso em 30 abr. 2004.

MITCHELL, T. G. ; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clin. Microbiol.Rev.** v. 8, n. 4, p. 515-548, 1995.

MONARI, C.; BALDELLI, F.; PIETRELLA, D.; RETINI, C.; TASCINI, C.; FRANCISCI, D. Monocyte dysfunction in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) versus *Cryptococcus neoformans*. **J. Infect.** v. 35, n. 3, p. 257-263, 1997.

MONARI, C.; RETINI, C.; CASADEVALL, A.; NETSKI, D.; BISTONI, F.; KOZEL, T. R. Differences in outcome of the interaction between *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan and human monocytes and neutrophils. **Eur.J.Immunol.**, v. 33, n. 4, p. 1041-1051, 2003.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J. & HIGGIS, E.A. nitric oxide: physiology, pathology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.** v. 43, p. 109-142, 1991.

MONTENEGRO, H.; PAULA, C. R. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of Sao Paulo, Brazil. **Med.Mycol.**, v. 38, n. 5, p. 385-390, 2000.

MOORE, K. W.; O'GARRA, A. ; de WAAL MALEFYT, R.; VIEIRA P, MOSMANN, T. R. Interleukin-10. **Annu. Rev Immunol.**, v.11: 165–190, 1993

MOSMANN, T.R.; CHERWISNKI, H.; BOND, M.W.; GREDLIN, M.A.; COFFMANN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profile of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol** v. 136, p. 2348-2357, 1986.

MOSMANN, T. R. and COFFMAN, R. L. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. **Adv. Immunol.**, 46, p. 111-147, 1989.

MOSMANN, T.R. & MOORE, K.W. The role of IL-10 in crossregulation of TH2 responses. **Immunol Today.** v. 12, p. 49-53, 1991.

MOYRAND, F.; KLAPROTH, B.; HIMMELREICH, U.; DROMER, F.; JANBON, G. Isolation and characterization of capsule structure mutant strains of *Cryptococcus neoformans*. **Mol. Microbiol.**, v. 45, n. 3, p. 837-849, 2002.

MOZAFFARIAN, N.; BERMAN, J. W.; CASADEVALL. A. Enhancement of nitric oxide synthesis by macrophages represents an additional mechanism of action for amphotericin B. **Antimicrob. Agents.Chemother.**, v. 41, n. 8, p. 1825-1829, 1997.

MURPHY, J. W.; ZHOU, A.;WONG, S. C. Direct interactions of human natural killer cells with *Cryptococcus neoformans* inhibit granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha production. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 11, p. 4564-4571, 1997.

MURPHY, P.M. Chemokine receptors: structure, function and role in microbial pathogenesis. **Cytokine Growth Factor Rev.** v. 7, p. 47-64, 1996.

NAKAMURA, Y. Molecular analyses of the serotype of *Cryptococcus neoformans*. **Nippon Ishinkin. Gakkai. Zasshi**, v. 42, n. 2, p. 69-74, 2001.

NARASIPURA, S. D.; AULT, J. G.; BEHR, M. J.;CHATURVEDI,V.;CHATURVEDI, S. Characterization of Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1) gene knock-out mutant of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: role in biology and virulence. **Mol.Microbiol.**, v. 47, n. 6, p. 1681-1694, 2003.

NARASIPURA, S. D.; CHATURVEDI, V.;CHATURVEDI, S. Characterization of *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* SOD2 reveals distinct roles of the two superoxide dismutases in fungal biology and virulence. **Mol. Microbiol.**, v. 55, n. 6, p. 1782-1800, 2005.

NATHAN, C. & XIE Q. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. **Cell.** v. 78, p. 915-918, 1994.

NATHAN, C. Inducible nitric oxide synthases: what difference does it make? **J. Clin Invest.** v. 100, p. 2417-2420, 1997.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts.

Approved standard M27-A2. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, Wayne, Pa.

NEILSON, J. B.; FROMTLING, R. A.; BULMER, G. S. *Cryptococcus neoformans*: size range of infectious particles from aerosolized soil. **Infect. Immun.**, v. 17, n. 3, p. 634-638, 1977.

NETEA, M. G.; BROUWER, A. E.; HOOGENDOORN, E. H.; VAN DER MEER, J. W.; KOOLEN, M.; VERWEIJ, P. E. Two patients with cryptococcal meningitis and idiopathic CD4 lymphopenia: defective cytokine production and reversal by recombinant interferon- gamma therapy. **Clin. Infect. Dis.**, v. 39, n. 9, p. e83-e87, 2004.

NGUYEN, M. H. ; YU, C. Y. In vitro comparative efficacy of voriconazole and itraconazole against fluconazole-susceptible and -resistant *Cryptococcus neoformans* isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 42, n. 2, p. 471-472, 1998.

NICHOLS, K. L.; BAUMAN, S. K.; SCHAFER, F. B.; MURPHY, J. W. Differences in components at delayed-type hypersensitivity reaction sites in mice immunized with either a protective or a nonprotective immunogen of *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 2, p. 591-600, 2002.

NOGUEIRA-MACHADO, J.A.; LIMA e SILVA, F.C.; MEDINA, L.O.; COSTA, D.C.; CHAVES, M.M. Modulation of the Reactive Oxygen Species (ROS) generation mediated by cyclic AMP-elevating agents or Interleukin 10 in granulocytes from type 2 diabetic patients (NIDDM): a PKA-independent phenomenon **Diabetes & Metabolism.** v. 29, n. 5, p. 533-537, 2003.

NOVERR, M. C.; PHARE, S. M.; TOEWS, G. B.; COFFEY, M. J.; HUFFNAGLE, G. B. Pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* produce immunomodulatory prostaglandins. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 5, p. 2957-2963, 2001.

OHKUSU, M.; TANGONAN, N.; TAKEO, K.; KISHIDA, E.; OHKUBO, M.; AOKI, S. et al. Serotype, mating type and ploidy of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from patients in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.** v. 44, n. 6, p. 299-302, 2002.

OLIVEIRA NETO, I.C. de et al. Meio século de criptococose no Brasil; revisão de 308 casos (1942-1992). **Âmb. Hosp.** V.5 p. 5-16, 1993

OLSZEWSKI, M. A.; HUFFNAGLE, G. B.; MCDONALD, R. A.; LINDELL, D. M.; MOORE, B. B.; COOK, D. N. The role of macrophage inflammatory protein-1 alpha/CCL3 in regulation of T cell-mediated immunity to *Cryptococcus neoformans* infection. **J. Immunol.**, v. 165, n. 11, p. 6429-6436, 2000.

OLSZEWSKI, M. A.; HUFFNAGLE, G. B.; TRAYNOR, T. R.; MCDONALD, R. A.; COOK, D. N.; TOEWS, G. B. Regulatory effects of macrophage inflammatory protein

1 $\alpha$ /CCL3 on the development of immunity to *Cryptococcus neoformans* depend on expression of early inflammatory cytokines. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 10, p. 6256-6263, 2001.

PALMER, R.; ASHTON, D. & MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L – arginine. **Nature**. v. 333, p. 664-668, 1998. Pará, Brasil. **Rev. da Soc. Brás. de Med. Trop.** v.32; p. 505- 508, 1999.

PASSONI, L. F.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M. M.; LAZERA, M. S. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: an analysis of the domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. **Med. Mycol.**, v. 36, n. 5, p. 305-311, 1998.

PATERHANS, E. In: “**Cellular Chemiluminescence**”. K. Van Dyke, C. Castranova ed. CRC press. Boca Raton, Flórida, 1986.

PEETERMANS, W.; BOBBAERS, H.; VERHAEGEN, J.; VANDEPITTE, J. Fluconazole-resistant *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in an AIDS patient. **Acta Clin. Belg.** v. 48, n. 6, p. 405-409, 1993.

PERFECT, J.R.; DURACK, D.T. Penetration of imidazoles and triazoles into cerebrospinal fluid of rabbits. **J. Chemother.** v.16,p.81-86, 1986.

PERFECT, J. R.; COX, G. M.; DODGE, R. K.; SCHELL, W. A. In vitro and in vivo efficacies of the azole SCH56592 against *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 40, n. 8, p. 1910-1913, 1996.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; BOYKEN, L.; RICE, C.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R. J. Evaluation of the NCCLS M44-P disk diffusion method for determining susceptibilities of 276 clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* to fluconazole. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 1, p. 380-383, 2004.

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D. J. In vitro susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species to itraconazole: global survey of 9,359 isolates tested by clinical and laboratory standards institute broth microdilution methods. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 8, p. 3807-3810, 2005.

PIETRELLA, D.; MONARI, C.; RETINI, C.; PALAZZETTI, B.; KOZEL, T. R.; VECCHIARELLI, A. HIV type 1 envelope glycoprotein gp120 induces development of a T helper type 2 response to *Cryptococcus neoformans*. **AIDS**, v. 13, n. 16, p. 2197-2207, 1999.

PIETRELLA, D.; PERITO, S.; BISTONI, F.; VECCHIARELLI, A. Cytotoxic T lymphocyte antigen costimulation influences T-cell activation in response to *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 3, p. 1508-1514, 2001.

PIETRELLA, D.; KOZEL, T. R.; MONARI, C.; BISTONI, F.; VECCHIARELLI, A. Interleukin-12 counterbalances the deleterious effect of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp120 on the immune response to *Cryptococcus neoformans*. **J. Infect. Dis.** v. 183, n. 1, p. 51-58, 2001.

PIETRELLA, D.; MAZZOLLA, R.; LUPO, P.; PITZURRA, L.; GOMEZ, M. J.; CHERNIAK, R. Mannoprotein from *Cryptococcus neoformans* promotes T-helper type 1 anticandidal responses in mice. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 12, p. 6621-6627, 2002

PIETRELLA, D.; LUPO, P.; BISTONI, F.; VECCHIARELLI, A. An early imbalance of interleukin 12 influences the adjuvant effect of mannoproteins of *Cryptococcus neoformans*. **Cell Microbiol.**, v. 6, n. 9, p. 883-891, 2004.

PINNER, R. W.; HAJJEH, R. A.; POWDERLY, W. G. Prospects for preventing cryptococcosis in persons infected with human immunodeficiency virus. **Clin. Infect. Dis.** v. 21 Suppl 1, p. 103-107, 1995.

POLACHECK, I.; KWON-CHUNG, K. J. Melanogenesis in *Cryptococcus neoformans*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 134, n. 4, p. 1037-1041, 1988.

POLACHECK, I.; PLATT, Y.; ARONOVITCH, J. Catecholamines and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 58, n. 9, p. 2919-2922, 1990.

POWDERLY, W. G. Fungal infections in patients infected with HIV. **Mo.Med.**, v. 87, n. 6, p. 348-350, 1990.

POWELL, K. E.; DAHL, B. A.; WEEKS, R. J.; TOSH, F. E. Airborne *Cryptococcus neoformans*: particles from pigeon excreta compatible with alveolar deposition. **J. Infect. Dis.**, v. 125, n. 4, p. 412-415, 1972.

PROTÓN, J.; QUINDÓS, G. Las micosis en la década de 1990. **Enf. Infect. Microbiol. Clin.** v.10,p.385-388, 1992.

QURESHI, M. H.; ZHANG, T.; KOGUCHI, Y.; NAKASHIMA, K.; OKAMURA, H.; KURIMOTO, M. Combined effects of IL-12 and IL-18 on the clinical course and local cytokine production in murine pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. **Eur. J. Immunol.**, v. 29, n. 2, p. 643-649, 1999.

RAYHANE, N.; LORTHOLARY, O.; FITTING, C.; CALLEBERT, J.; HUERRE, M.; DROMER, F. Enhanced sensitivity of tumor necrosis factor/lymphotoxin-alpha-

deficient mice to *Cryptococcus neoformans* infection despite increased levels of nitrite/nitrate, interferon-gamma, and interleukin-12. **J. Infect. Dis.** v. 180, n. 5, p. 1637-1647, 1999.

REARDON, C. C.; KIM, S. J.; WAGNER, R. P.; KORNFELD, H. Interferon-gamma reduces the capacity of human alveolar macrophages to inhibit growth of *Cryptococcus neoformans* in vitro. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.** v. 15, n. 6, p. 711-715, 1996.

REIDEL, D.D. & KAUFMANN, S.H.E. Chemokine secretion by human polymorphonuclear granulocytes after stimulation with *Mycobacterium tuberculosis* and lipoarabinomannan. **Infect. Immunity.** v.65, p.4620-4623, 1997.

RETINI, C.; VECCHIARELLI, A.; MONARI, C.; BISTONI, F.; KOZEL, T. R. Encapsulation of *Cryptococcus neoformans* with glucuronoxylomannan inhibits the antigen-presenting capacity of monocytes. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 2, p. 664-669, 1998.

RETINI, C.; KOZEL, T. R.; PIETRELLA, D.; MONARI, C.; BISTONI, F.; VECCHIARELLI, A. Interdependency of interleukin-10 and interleukin-12 in regulation of T-cell differentiation and effector function of monocytes in response to stimulation with *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 10, p. 6064-6073, 2001.

RIPPON JW. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. **Medical Mycology**. 3.ed, Philadelphia, WB Saunders, 1988.

RIVERA, J.; MUKHERJEE, J.; WEISS, L. M.; CASADEVALL, A. Antibody efficacy in murine pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection: a role for nitric oxide. **J.Immunol.**, v. 168, n. 7, p. 3419-3427, 2002.

ROCHA, M.F.G.; SIDRIM, J.J.C. Fundamentos clínicos e laboratoriais da Micologia Medica Drogas Antifungicas. Guanabara-Koogan, 1999, cap.5, p. 171-191.

ROMAGNANI, S. Biology of human Th1 and Th2 cells. **J. Immunol** v. 15, p. 121-129, 1995.

ROSSI, G. R.; CERVI, L. A.; GARCIA, M. M.; CHIAPELLO, L. S.; SASTRE, D. A.;MASIH, D. T. Involvement of nitric oxide in protecting mechanism during experimental cryptococcosis. **Clin. Immunol.**, v. 90, n. 2, p. 256-265, 1999.

ROSSI, G. R.; SASTRE, D. A.; RUBINSTEIN, H. R.;MASIH, D. T. Biochemical basis for the killing of *Cryptococcus neoformans* by rat peritoneal cells. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 32, n. 6, p. 405-414, 1994.

- ROVIRA, I. Óxido nítrico. **Rev. Esp. Anesthesiol. Reanim.** v. 42, p. 15-23, 1995.
- ROZEMBAUM, R.; RIOS-GONÇALVES, A.J. Clinical epidemiological study of 171 cases of cryptococcosis. **Clin. Infect. Dis.** v18,p.369-380, 1994.
- ROZEMBAUM, R.; RIOS-GONÇALVES, A.J.; WANKE, B.; CAIUBY, M.J.; CLEMENTE, H.; LAZERA, M.S.; MONTEIRO, P.C.; LONDERO, A.T. *Cryptococcus neoformans* varieties as agents of criptococose in Brazil. **Arq. Bras. Med.** v. 66, p.261-263, 1992.
- SAAG, M. S.; GRAYBILL, R. J.; LARSEN, R. A.; PAPPAS, P. G.; PERFECT, J. R.; POWDERLY, W. G. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, n. 4, p. 710-718, 2000.
- SANTOS, I.; COELHO, M. S.; SOUSA, R. C. S. Meningoencefalite criptocócica: SCHIMID, T.J. & WEISMANN C. Induction of mRNA for a serine protease and a beta-thromboglobulin-like protein in mitogen-stimulated human leucocytes. **J. Immunol.** v. 139, p. 250-256, 1987.
- SEATON, R. A.; NARAQI, S.; WEMBRI, J. P.; WARRELL, D. A. Predictors of outcome in *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* meningitis. **QJM.** v. 89, n. 6, p. 423-428, 1996.
- SHAN, S. V. In: “**Cellular Chemiluminescence**”. K. Van Dyke, C. Castranova ed. CRC press. Boca Raton, Flórida, 1986.
- SHAO, X.; MEDNICK, A.; ALVAREZ, M.; VAN, R. N.; CASADEVALL, A.; GOLDMAN, D. L. An innate immune system cell is a major determinant of species-related susceptibility differences to fungal pneumonia. **J. Immunol.**, v. 175, n. 5, p. 3244-3251, 2005.
- SHOHAM, S. ; LEVITZ, S. M. The immune response to fungal infections. **British J. of Haematology**, v. 129, n. 5, p. 569-582, 2005.
- SHOHAM, S.; HUANG, C.; CHEN, J. M.; GOLENBOCK, D. T.; LEVITZ, S. M. Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF-alpha release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. **J. Immunol.**, v. 166, n. 7, p. 4620-4626, 2001.
- SIDDIQUI, A. A.; BROUWER, A. E.; WUTHIEKANUN, V.; JAFFAR, S.; SHATTOCK, R.; IRVING, D. IFN-gamma at the site of infection determines rate of clearance of infection in cryptococcal meningitis. **J. Immunol.**, v. 174, n. 3, p. 1746-1750, 2005.

SIDDIQUI, T. J.; ZAMANI, T.; PARADA, J. P. Primary cryptococcal prostatitis and correlation with serum prostate specific antigen in a renal transplant recipient. **J. Infect.**, v. 51, n. 3, p. e153-e157, 2005.

SIDRIM, J.L.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Único. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 388p.

SPEED, B. ; DUNT, D. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Clin. Infect. Dis.** v. 21, n. 1, p. 28-34, 1995.

SPRENGER, H.; KRAUSE, A.; KAUFMANN, A.; PRIEM, S.; FABIAN, D.; BURMESTER, G. R.; GEMSA, D.; RITTIG, M.G. *Borrelia burgdorferi* induces chemokines in human monocytes. **Infect. and Immunity.** v. 65, p. 4384-4388, 1997.

SPRENGER, H., MEYER, R.G., KAUFMANN, A., RISCHIKOWSKY, E. & GEMSA, D., Selective induction of monocyte and not neutrophil-attracting chemokines after influenza A virus infection. **J. Exp. Med.** v. 184, p. 1191-1196, 1996.

STAIB, F. et al. The Brown Colour Effect (BCE) of *Cryptococcus neoformans* in the diagnosis, control and epidemiology of *C. neoformans* infections in AIDS patients. **Zbl. Bakt. Hyg. A.** v. 266, 167-177, 1987.

STAPLES, K.J.; BERGMANN, M.; BARNES, P.J.; NEWTON, R. Stimulus-specific inhibition of IL-5 by cAMP-elevating agents and IL-10 reveals differential mechanisms of action. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.273, p.811-815, 2000.

STEVENS, D.A.; Combination immunotherapy and antifungal chemotherapy. **Clin. Infect. Dis.** v.26,p.1266-1269, 1998.

STJERNHOLM R.L.; MANAK R C Carbohydrate metabolism in leukocytes. XIV. Regulation of pentose cycle activity and glycogen metabolism during phagocytosis. **J Reticuloendothel. Soc.**, v. 8., n. 6., p. 550-560, 1970

SUMMERS, S. A.; DORLING, A.; BOYLE, J. J.; SHAUNAK, S. Cure of disseminated cryptococcal infection in a renal allograft recipient after addition of gamma-interferon to anti-fungal therapy. **Am. J. Transplant.**, v. 5, n. 8, p. 2067-2069, 2005.

SUNG, J.P., CAMPBELL, G. D.; GREND AHL J. G. Miconazole therapy for fungal meningitis. **Arch. Intern. Med.** v. 35., p. 443-447, 1978

SZABÓ, C. & THEIMERMANN, C. Regulation of the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase. In: Nitric oxide- Biochemistry, Molecular Biology, and implications. Adv. Pharmacol. v. 34, Ignarro I. & Murad F. (Ed.), Acad, Press, 113-153, 1995.

TAUBER A. I. ; BABIOR, B. M.. Evidence for hydroxyl radical production by human neutrophils **J. Clin. Invest.** v. 60., n. 2., p. 374-379, 1977

TERREL, C. L. Antifungal Agents. Pat. II The Azoles. **Mayo. Cli. Proc.** v.100, p.74-78, 1999.

TOHYAMA, M.; KAWAKAMI, K.; FUTENMA, M.;SAITO, A. Enhancing effect of oxygen radical scavengers on murine macrophage anticryptococcal activity through production of nitric oxide. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 103, n. 3, p. 436-441, 1996.

TOHYAMA, M.; KAWAKAMI, K.; SAITO, A. Anticryptococcal effect of amphotericin B is mediated through macrophage production of nitric oxide. **Antimicrob. Agents. Chemother.** v. 40, n. 8, p. 1919-1923, 1996.

TOLKOFF-RUBIN, N. E. ; RUBIN, R. H. Opportunistic fungal and bacterial infection in the renal transplant recipient. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 2, n. 12 Suppl, p. S264-S269, 1992.

TORRES-RODRIGUEZ, J. M.; MORERA, Y.; BARO, T.; COROMINAS, J. M.;CASTANEDA, E. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in an immunocompetent mouse model. **Med.Mycol.**, v. 41, n. 1, p. 59-63, 2003.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2004, 718p.

TRAJKOVIC, V.; STEPANOVIC, S.; SAMARDZIC, T.; JANKOVIC, V.; BADOVINAC, V.; MOSTARICA, S. M. *Cryptococcus neoformans* neutralizes macrophage and astrocyte derived nitric oxide without interfering with inducible nitric oxide synthase induction or catalytic activity - possible involvement of nitric oxide consumption. **Scand. J. Immunol.**, v. 51, n. 4, p. 384-391, 2000.

TREJO, W. H.; BENNETT, R. E. *Streptomyces nodosus* sp. The amphotericin producing organism. **J. Bacteriol.** v.85, p.436-439, 1963.

TRILLES, L.; FERNANDEZ-TORRES, B.; LAZERA, M. S.; WANKE, B.;GUARRO, J. In vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*. **J. Clin. Microbiol.** v. 42, n. 10, p. 4815-4817, 2004.

Van DYKE, K.; Van DYKE C. Cellular chemiluminescence associated with disease states. **Methods in Enzymology.**, v.133., p. 493-507, 1986

VANDEN BOSSCHE, H.; MARICHAL, P.; ODDS, F.; C. Molecular mechanism of drug resistance in fungi. **Trends. Microbiol.** V.2, p.393-400, 1994.

VANDEN, B. H. Mechanisms of antifungal resistance. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 14, n. 2, p. 44-49, 1997.

VANDEN, B. H.; DROMER, F.; IMPROVISI, I.; LOZANO-CHIU, M.; REX, J. H.; SANGULARD, D. Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. **Med. Mycol.**, v. 36 Suppl 1, p. 119-128, 1998.

VANDEN, B. H.; MARICHAL, P.; LE, J. L.; COENE, M. C.; GORRENS, J.; COOLS, W. Effects of itraconazole on cytochrome P-450-dependent sterol 14 alpha-demethylation and reduction of 3-ketosteroids in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob. Agents. Chemother.** v. 37, n. 10, p. 2101-2105, 1993.

VECCHIARELLI, A.; PIETRELLA, D.; LUPO, P.; BISTONI, F.; MCFADDEN, D. C.; CASADEVALL, A. The polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans* interferes with human dendritic cell maturation and activation. **J. Leukoc. Biol.**, v. 74, n. 3, p. 370-378, 2003.

VELLA, A.T. & PEARCE, E.J. CD4+ Th2 response induced by *Schistosoma mansoni* eggs develops rapidly, through an early, Th0 like stage. **J. Immunol.** v.148, p.2283-2290, 1992.

WALENKAMP, A. M.; ELLERBROEK, P.; SCHARRINGA, J.; RIJKERS, E.; HOEPELMAN, A. I.; COENJAERTS, F. E. Interference of *Cryptococcus neoformans* with human neutrophil migration. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 531, p. 315-339, 2003.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 7, p. 3004-3007, 1994.

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

WASHBURN, R. G.; BRYANT-VARELA, B. J.; JULIAN, N. C.; BENNETT, J. E. Differences in *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide structure influence assembly of alternative complement pathway C3 convertase on fungal surfaces. **Mol. Immunol.**, v. 28, n. 4-5, p. 465-470, 1991.

WEY, S.B.; MORI, M.; PFALLER, M.A.; WOOSLON, R.F.; WENZEL, P.R. Hospital acquired candidemia the attributable mortality and excess length of stay. **Arch. Intern. Med.** v.148,p.2642-2645, 1988.

WHITE, M. H. ; ARMSTRONG, D. Cryptococcosis. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 8, n. 2, p. 383-398, 1994.

WILSON, D. E.; BENNETT, J. E.; BAILEY, J. W. Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 127, n. 3, p. 820-823, 1968.

WORMLEY, F. L., Jr.; PERFECT, J. R. Immunology of infection caused by *Cryptococcus neoformans*. **Methods Mol.Med.**, v. 118, p. 193-198, 2005.

WORMLEY, F. L., Jr.; HEINRICH, G.; MILLER, J. L.; PERFECT, J. R.; COX, G. M. Identification and characterization of an SKN7 homologue in *Cryptococcus neoformans*. **Infect.Immun.**, v. 73, n. 8, p. 5022-5030, 2005.

WRIGHT, L.; BUBB, W.; DAVIDSON, J.; SANTANGELO, R.; KROCKENBERGER, M.; HIMMELREICH, U. et al. Metabolites released by *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and var. *gattii* differentially affect human neutrophil function. **Microbes. Infect.**, v. 4, n. 14, p. 1427-1438, 2002.

XIE, Q.; CHO, H.; CALAYCAY, J.; MUMFORD, R.; SWIDERICK, K.; LEE, T.; DING, A.; TROSO, T.; NATHAN, C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. **Science**. V. 256, p. 225-229, 1992.

YOUNG, B. J. ; KOZEL, T. R. Effects of strain variation, serotype, and structural modification on kinetics for activation and binding of C3 to *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 7, p. 2966-2972, 1993.

ZAITS, Clarisse. **Compêndio de Micologia Médica**. Rio de Janeiro: Medsi, 1998, 434p.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)