



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

**Diferenças na interação de isolados clínicos de
Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii* com
macrófagos murinos**

JÉSSICA DOS SANTOS FOLHA

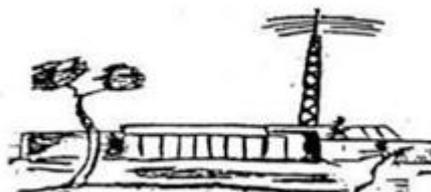
Brasília
2020

Diferenças na interação de isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* com macrófagos murinos

JÉSSICA DOS SANTOS FOLHA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como pré requisito para obtenção do título de Doutor em medicina tropical.

Orientadora: Dra. Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola



**Brasília-DF
2020**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

df664d dos Santos Folha, Jéssica
Diferenças na interação de isolados clinicos de
Cryptococcus neoformans e Cryptococcus gattii com macrófagos
murinos / Jéssica dos Santos Folha; orientador Patricia
Albuquerque de Andrade Nicola. -- Brasília, 2020.
108 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Medicina Tropical) --
Universidade de Brasília, 2020.

1. Criptococose. 2. macrófagos murinos. 3. Cryptococcus
spp. 4. Cryptococcus neoformans. 5. Cryptococcus gattii. I.
Albuquerque de Andrade Nicola, Patricia, orient. II. Título.

COMPOSIÇÃO BANCA EXAMINADORA

Jéssica dos Santos Folha

Diferenças na interação de isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* e
Cryptococcus gattii com macrófagos

Universidade de Brasília

Medicina Tropical: Biologia das doenças infecciosas e parasitárias

Data da defesa da tese

18 de Dezembro de 2020

Banca Examinadora

Profa Dra. Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola- Universidade de
Brasília (Presidente).

Profa Dra. Calliandra de Souza Silva- Universidade Católica de Brasília
(Membra Externa)

Profa Dra. Fabiana Brandão Alves Silva- Universidade de Brasília (Membra
interna)

Prof Dr. Rodrigo Gurgel Gonçalves- Universidade de Brasília (Membro interno)

Prof Dr. Jhones do Nascimento Dias- Universidade de Brasília (Membro
Suplente)

“Ainda que eu falasse a língua dos homens e dos anjos, e não tivesse amor seria como o metal que soa ou como o címbalo que retine. E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios da ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse montes, e não tivesse amor, nada seria”.

I Coríntios 13: 1-2.

DEDICATÓRIA

Eu dedico esse importante trabalho à minha família, meus queridos pais Paula Cristina e José Benedito, que me amaram e educaram para que eu pudesse ser o que sou hoje.

Em especial dedico ao meu amado Eduardo, mas conhecido como Dudu, meu irmão que é a pessoa a qual eu apresento o amor mais puro do mundo, ele me inspira a ser melhor, além de ser a pessoa que mais admiro no mundo, pela sua doçura, amabilidade, carisma e inteligência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, meu criador e redentor, pelo dom da vida e pela oportunidade de chegar até aqui e por tudo que já fez por mim em todos esses anos.

Agradeço em especial a Jeferson Tavares que esteve ao meu lado em momentos difíceis entre todos esses anos de doutorado, que se me apoiou e acreditou em mim.

À minha orientadora, Prof.^a Patrícia Albuquerque, pela orientação, paciência, compreensão, dedicação e ajuda. Obrigada pela oportunidade.

Agradeço ao pessoal do laboratório que trabalho, pelas parcerias, ajudas, e troca de aprendizados.

A Jhones, Fabian, Lara, entre outros que em algum momento foram solícitos quando precisei.

Por cada professor que passou pela minha vida e me ensinou um pouco do que sei e do que sou hoje.

A minha amiga de alma e parceira de dança Tamires Rodrigues, pela cumplicidade e parceria.

A Any Carolina pela amizade e irmandade de muitos anos.

As minhas amigas Clemilda Carlos e Walquiria Bispo pela amizade e companheirismo desde a época da graduação.

A Vitória e Anne que além de estagiárias se tornaram minhas amigas.

A Camile que me ajudou muito na preparação desse trabalho, e me deu apoio em muitos momentos que precisei.

E as todos que direta ou indiretamente me ajudaram quando precisei.

A minha psicóloga Silvana que a cada semana me ajuda e ensina formas e maneiras de ser mais feliz.

E as pessoas que oraram, oram e torcem por mim, meu grande obrigado.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Incidência anual de infecções criptocócicas.

Figura 2 – Ciclo de infecção por *Cryptococcus*.

Figura 3- Taxa de letalidade associada a criptococose: causas associadas nos estados brasileiros

Figura 4- Classificação de espécies do gênero *Cryptococcus* em sorotipos e tipos moleculares

Figura 5- Plasticidade fenotípica dos macrófagos em interação com *Cryptococcus*

Figura 6- Resposta imune a *Cryptococcus*

Figura - Esquema representativo de preparação de macrófagos derivados de medula óssea.

Figura 8 – Esquema representativo do preparo de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp para as análises com macrófagos.

Figura 9- Esquema representativo do ensaio de fagocitose.

Figura 10– Esquema representativo do ensaio de sobrevivência fúngica.

Figura 11 - Esquema representativo do ensaio de dosagem de citocinas por ELISA.

Figura 12- Histograma descritivo do percentual de fagocitose dos diferentes isolados clínicos de *Cryptococcus* spp por macrófagos

Figura 13- Histograma descritivo do percentual de fagocitose das 12 linhagens clínicas de *C. gattii* da FIOCRUZ do Rio de Janeiro

Figura 14- Histograma descritivo do percentual de fagocitose das 10 linhagens *C. neoformans* provenientes do LACEN de Brasília

Figura 15- Histograma descritivo do índice fagocítico dos diferentes isolados clínicos de *Cryptococcus* spp por macrófagos

Figura 16- Histograma descritivo do índice de sobrevivência fúngica dos diferentes isolados clínicos de *Cryptococcus* spp por macrófagos.

Figura 17- Histograma descritivo do índice de sobrevivência dos 10 isolados de *Cryptococcus neoformans* do LACEN de Brasília

Figura 18- Histograma descritivo da indução de produção IL-6 dos diferentes isolados clínicos de *Cryptococcus* spp por macrófagos

Figura 19- Histograma descritivo da indução de produção TNF- α dos diferentes isolados clínicos de *Cryptococcus* spp por macrófagos

Figura 20- Histograma descritivo da indução de produção MCP-1 dos diferentes isolados clínicos de *Cryptococcus* spp por macrófagos

Figura 21- Avaliação da capacidade fagocítica de macrófagos após interação com *C. neoformans* (CnF) e *C. gattii* (CgF)

Figura 22- Comparação dos índices fagocíticos da interação de macrófagos murinos com os isolados de *C. neoformans* (CnF) e *C. gattii* (CgF)

Figura 23- Índice de sobrevivência fúngica de isolados de *C. neoformans* (CnF) e *C. gattii* (CgF)

Figura 24- Produção de TNF- α por macrófagos murinos que interagiram por 24h com isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* da FIOCRUZ do Rio de Janeiro

Figura 25- Produção de IL-6 por macrófagos murinos que interagiram por 24h com isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* da FIOCRUZ do Rio de Janeiro

Figura 26- Produção de MCP-1 por macrófagos murinos que interagiram por 24h com isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* da FIOCRUZ do Rio de Janeiro

Figura 27- Análise de correlação do percentual de fagocitose com o índice de sobrevivência fúngica dos diferentes isolados de *C. neoformans* após a interação com macrófagos

Figura 28- Correlação entre a taxa de internalização do isolados por macrófagos e a taxa de sobrevivência das linhagens clínicas de *C. gattii* da FIOCRUZ de Rio de Janeiro após a interação com macrófagos

Figura 29- Correlação entre a taxa de internalização do isolados por macrófagos e a taxa de sobrevivência das linhagens clínicas de *C. neoformans* do LACEN de Brasília após a interação com macrófagos

Figura 30- Correlação negativa entre a produção de IL-6 por macrófagos e a taxa de sobrevivência das linhagens clínicas de *C. neoformans* da FIOCRUZ de Rio de Janeiro após a interação com macrófagos

Figura 31- Ausência de correlação entre a produção de TNF- α por macrófagos e a taxa de sobrevivência das linhagens clínicas de *C. neoformans* da FIOCRUZ de Rio de Janeiro após a interação com macrófagos

Figura 32- Correlação negativa entre a produção de MCP-1 por macrófagos e a taxa de sobrevivência das linhagens clínicas de *C. neoformans* da FIOCRUZ de Rio de Janeiro após a interação com macrófagos.

Figura 33- Ausência de correlação entre a produção de IL-6 por macrófagos e a taxa de sobrevivência das linhagens clínicas de *C. gattii* da FIOCRUZ de Rio de Janeiro após a interação com macrófagos.

Figura 34- Ausência de correlação entre a produção de TNF- α por macrófagos e a taxa de sobrevivência das linhagens clínicas de *C. gattii* da FIOCRUZ de Rio de Janeiro após a interação com macrófagos.

Figura 35- Ausência correlação entre a produção de MCP-1 por macrófagos e a taxa de sobrevivência das linhagens clínicas de *C. gattii* da FIOCRUZ de Rio de Janeiro após a interação com macrófagos.

LISTA DE ABREVIATURAS

% – Por cento

AIDS- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

BMM - Macrófagos Derivados de Medula Óssea

CAPES- da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CDC- Centers for Disease Control and Prevention

CFU- Unidade Formadora de Colônias

CrAg- Antígeno criptocócico

DC- célula dendrítica

DPG- Decanato de Pós-graduação

ELISA- Ensaio de ligação imunoenzimático

GalXM – Galactoxilomanana

GM-CSF Fator de Crescimento de Granulócitos e Macrófagos

GXM – Glicuronoxilomanana

h – Hora

HEPES- (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

IFN Interferon

IL- Interleucina

LFA- Lateal Flow Assay

MAP- Mitogen Activated Protein

MCP- Proteína quimiotática de macrófagos

mL – Mililitros

°C – Graus Celsius

PBS- Tampão Fosfato Salina

RBC- Rede de Criptococose Brasileira

RPMI- Meio Roswell Park Memorial Institute

SNC- Sistema nervoso central

TNF- Fator de Necrose Tumoral

TWEEN- Polietileno Glicol Monoestearato de Sorbitano

UnB- Universidade de Brasília

µL – Microlitro

ORGÃOS FINANCIADORES

A aluna recebeu apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior para a execução do doutorado. Também recebeu auxílio para desenvolvimento da tese do Decanato de Pós-graduação (DPG) edital DPG/UnB nº 11/2019.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Criptococose.....	17
1.2 Epidemiologia da criptococose.....	23
1.3 Epidemiologia da criptococose no Brasil.....	24
1.4 <i>Cryptococcus</i> spp.....	25
1.5 Atributos de virulência do <i>Cryptococcus</i> spp.....	29
1.6 Imunologia da criptococose.....	32
2. PERGUNTA DA PESQUISA.....	35
3. JUSTIFICATIVA.....	36
4. OBJETIVO.....	37
4.1 Objetivo Geral.....	37
4.2 Objetivos Específicos.....	37
5. METODOLOGIA.....	37
5.1 Cultura e diferenciação dos macrófagos murinos derivados de medula de camundongos Balb/C.....	37
5.2 Isolados clínicos utilizados e cultura dos espécimes para os ensaios.....	39
5.3 Cultura de células J774.....	41
5.4 Interação com macrófagos murinos: ensaio de fagocitose e índice fagocítico.....	41
5.5 Interação com macrófagos murinos: ensaio de morte fúngica (UFC) ...	40
5.6 Interação com macrófagos murinos: ensaio de dosagem de citocinas por ELISA.....	44

5.7 Análises estatísticas	45
6. RESULTADOS	46
6.1 Diferenças nas resultantes da interação com macrófagos entre soldados clínicos de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> : taxa de fagocitose, índice fagocítico, sobrevivência fúngica e produção de citocinas inflamatórias.....	46
6.2 Comparações entre espécies do Rio de Janeiro.....	55
6.3 Correlação dos isolados com seus fatores de virulência.....	61
7. DISCUSSÃO.....	68
8. LIMITAÇÕES.....	74
9. CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
ANEXO I.....	100
ANEXO II.....	105
ANEXO III.....	106

Resumo

A criptococose é uma doença causada por fungos do gênero *Cryptococcus* responsável por cerca de 181.000 mortes todos os anos. Leveduras de *Cryptococcus neoformans* geralmente causam doenças em pacientes imunocomprometidos, enquanto a espécie irmã *Cryptococcus gattii* é mais frequentemente associada à doença em hospedeiros aparentemente imunocompetentes. Neste trabalho, testamos a hipótese de que isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* apresentam diferenças fenotípicas na sua interação com macrófagos murinos. Para isso células de isolados de *C. neoformans* (16 isolados da Fiocruz/RJ e 10 isolados do LACEN/DF) ou *C. gattii* (12 isolados da Fiocruz/RJ) foram co-incubadas com macrófagos derivados da medula óssea (BMM - tipo M1) de camundongos BALB/c ou células imortalizadas da linhagem J774 por 2h ou 24h. Após a interação avaliamos a fagocitose, sobrevivência fúngica e produção de citocinas por macrófagos. Em média, os isolados de *C. gattii* da FIOCRUZ-RJ foram mais fagocitados e apresentam maior habilidade de sobreviver à interação ao mesmo tempo em que induziram uma maior produção de TNF-alfa nos macrófagos em relação aos isolados de *C. neoformans*. Em contrapartida, os isolados de *C. neoformans* foram capazes de induzir maior produção de MCP-1 por macrófagos em relação aos isolados de *C. gattii*. Observamos também uma correlação positiva entre a sobrevivência fúngica e a taxa de fagocitose dos isolados de *C. neoformans* da FIOCRUZ/RJ, indicando que quanto maior for a internalização do fungo, maior a sua taxa de sobrevivência. Nós também observamos uma correlação negativa entre a produção da citocina IL-6, e a quimiocina MCP-1 por macrófagos e a sobrevivência fúngica após a interação para os isolados clínicos de *C. neoformans* da FIOCRUZ/RJ. Em conclusão, isolados de *C. gattii* foram fagocitados com mais eficiência, o que já havia sido previamente associado a uma melhor sobrevivência dos fungos no sistema nervoso central. Os isolados de *C. gattii* também conseguiram resistir melhor à atividade antifúngica do macrófago e induziram uma diminuição da secreção de MCP-1 por macrófagos. O melhor entendimento das diferenças na interação de isolados das duas espécies com macrófagos poderá ajudar a entender melhor possíveis razões para as diferenças clínicas entre a criptococose causada por *C. neoformans* e a criptococose causada por *C. gattii*.

Palavras chaves: Criptococose, macrófagos murinos, *Cryptococcus* spp, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*.

Abstract

Cryptococcosis is a disease caused by fungi of the genus *Cryptococcus* that kills about 181,000 individuals every year. *Cryptococcus neoformans* yeast cells generally causes disease in immunocompromised patients, while the sister-species *Cryptococcus gattii* is more often associated with the disease in apparently immunocompetent hosts. In this work, we tested the hypothesis that there are phenotypical differences in the interaction of isolates of *C. neoformans* and *C. gattii* with murine macrophages. For that, isolates of *C. neoformans* (16 isolates from Fiocruz/RJ and 10 isolates from LACEN/DF) and *C. gattii* (12 isolates from Fiocruz/RJ) were co-incubated with Bone marrow derived macrophages (BMM - type M1) or with the immortalized murine macrophage lineage J774 for 2h or 24h. After the interaction, we evaluated fungal phagocytosis and survival and the production of cytokines by the macrophages. The isolates of *C. gattii* from FIOCRUZ-RJ were more phagocytized and survived better after the interaction, while they induced a greater production of TNF-alpha in macrophages compared to isolates of *C. neoformans*. In contrast, the isolates of *C. neoformans* were able to induce greater production of MCP-1 by macrophages compared to isolates of *C. gattii*. We also observed a positive correlation between fungal survival and the phagocytosis rate of *C. neoformans* isolates from FIOCRUZ/RJ, indicating that the greater the internalization of the fungus, the greater its survival rate. We also observed a negative correlation between macrophage production of IL-6 and MCP-1 and fungal survival for the clinical isolates of *C. neoformans* from FIOCRUZ/RJ. In conclusion, isolates of *C. gattii* were more efficiently phagocytized, which was previously associated with better fungal survival in the central nervous system. *C. gattii* isolates were also presented increased ability to survive macrophage's antifungal activity and also induced decreased MCP-1 secretion by macrophages. A better comprehension of the interaction of both species with macrophages might help us to better understand the clinical differences between cryptococcosis caused by *C. neoformans* or *C. gattii*.

keywords: cryptococcosis, murine macrophages, *Cryptococcus* spp, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*.

1. Introdução

1.1. Criptococose

A criptococose é uma doença causada por fungos do gênero *Cryptococcus* que mata cerca de 181.000 seres humanos todos os anos. A doença é devastadora na África Subsaariana, e também afeta significativamente outras regiões do globo, como Ásia, Oceania, Europa e Américas. É estimado que 15% das mortes dos portadores de AIDS são acarretadas por meningite criptocócica (RAJASINGHAM *et al.*, 2017). A figura 1 demonstra a estimativa da incidência anual da infecção por país. Podemos observar que Brasil é um dos países com a maior incidência da criptococose na América Latina apresentando entre 1.001 a 2.500 casos anuais.

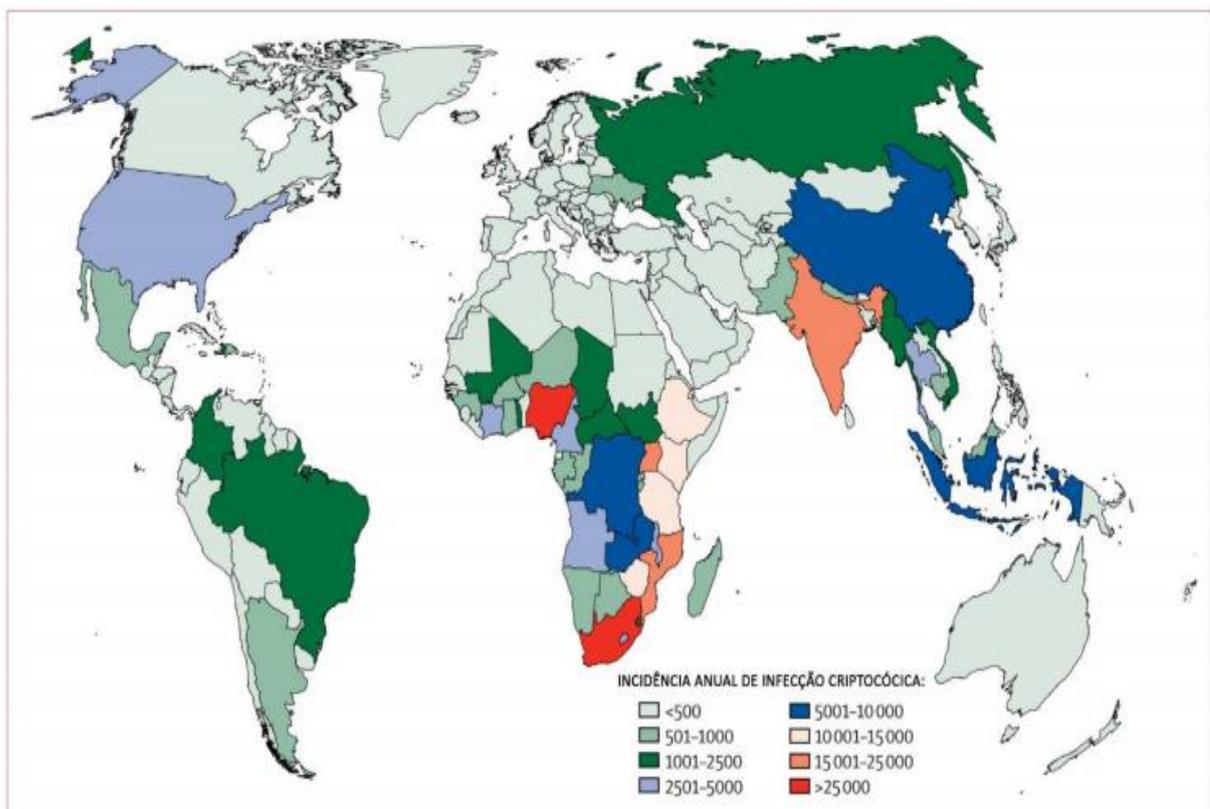


Figura 1. Incidência anual de infecções criptocócicas. Estimativa da incidência anual de infecções criptocócica por país em 2014. Estima-se que existam cerca de 278.000 pessoas positivas para antigenemia criptocócica no mundo. Fonte: Adaptado de Rajasingham *et al.*, 2017.

A criptococose é considerada uma das principais doenças fúngicas invasivas em humanos (LIN; HEITMAN, 2006). No ano de 1894 a criptococose foi identificada, quando o patologista Otto Busse e o médico Abraham Buschke, observaram juntos leveduras de *Cryptococcus* spp como a causa de um granuloma crônico do osso tibial em uma paciente de 31 anos. Entretanto, a criptococose humana só se tornou reconhecida como uma grande ameaça à saúde com o aparecimento da pandemia de AIDS na década de 1980, durante a qual essas infecções fúngicas se tornaram um padrão definidor da AIDS em pacientes com função de células T CD4 positivas bastante reduzida (MAY *et al.*,2016).

Nas últimas décadas houve um aumento significativo de infecções fúngicas invasivas. O aumento de indivíduos portadores do vírus HIV/AIDS, pacientes imunocomprometidos tais como transplantados e que fazem uso de quimioterápicos permeiam a causa da elevada incidência destas micoses. (RICHARDSON, LASS-FLÖRL, 2008; SPITZER *et al.*, 2017). Os gêneros *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* e *Pneumocystis* ocasionam por volta de 90% das mortes por doenças fúngicas (BROWN *et al.*, 2012).

A porta de entrada da infecção é via inalatória (Figura 2), e a doença pode acometer o homem e outros animais tendo um caráter principalmente oportunista, porém pode acometer pacientes imunocomprometidos, mas também pacientes com o sistema imunitário aparentemente saudável (QUEIROZ *et al.*,2008).

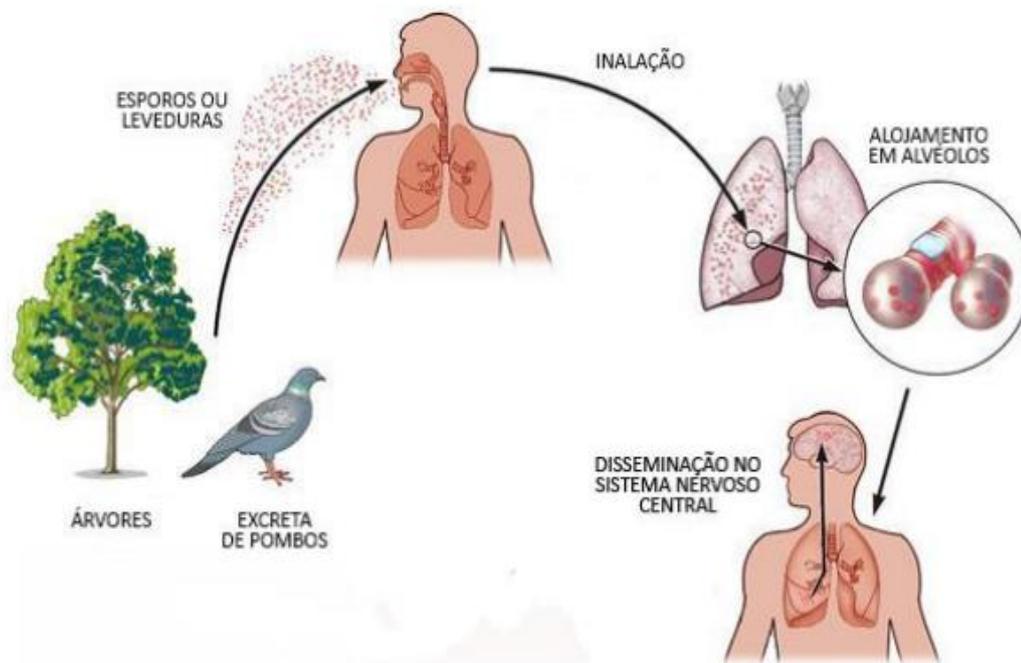


Figura 2. Ciclo de infecção por *Cryptococcus*. Na natureza, pode ser achado em excretas de pombos ou em árvores. A infecção ocorre pela inalação de partículas infecciosas, como leveduras ou esporos. Não sendo erradicada a infecção, o fungo então se instala nos alvéolos pulmonares, normalmente em granulomas de onde pode se proliferar quando acontece a imunossupressão. O fungo pode se alastrar e chegar ao sistema nervoso central, causando a meningite criptocócica. Fonte: adaptado de HULL & HEITMAN, 2002.

A distribuição molecular das espécies causadoras da criptococose apresenta padrões distintos dependendo da região. O tipo molecular mais comum no país é o VNI, seguido do VGII e VNII. O tipo VNI da espécie *C. neoformans* está presente em isolados clínicos e ambientais da região Sul-Sudeste. Já que o VGII de *C. gattii*, é mais comumente encontrado na macrorregião Norte-Nordeste (TRILLES *et al*, 2008; MARTINS *et al*, 2011).

Cryptococcus gattii é frequentemente isolado de plantas, estando associado a espécies nativas e exóticas de regiões tropicais e subtropicais (ARAÚJO JÚNIOR *et al.*, 2015).

O diagnóstico da criptococose pode ser realizado por meio de visualização direta por microscopia, cultura, métodos de procura de antígenos e por métodos moleculares. O método de visualização direta utiliza tinta nanquim em amostras do líquido, que evidencia um halo ao redor do fungo. A cultura do fungo em meio de cultura sólido em geral é mais efetiva em casos de alta carga fúngica, tendo baixa sensibilidade em amostras com cargas fúngicas baixas (MAZIARZ e PERFECT, 2016).

O método mais utilizado, hoje em dia, é o teste CrAg LFA (Ensaio de Fluxo Lateral para antígeno criptocócico, do inglês “Cryptococcal Antigen Lateral Flow Assay”), que é um teste rápido imunocromatográfico, que analisa antígenos e polissacarídeos do fungo de forma qualitativa e semi-qualitativa (KOZEL e BAUMAN, 2012; SKIPPER et al., 2019).

Existem outros testes diagnósticos para a doença como os testes de aglutinação em látex, e ensaios enzimáticos, entretanto, esses apresentam sensibilidade muito menor que a do CrAg (KOZEL e BAUMAN, 2012; SKIPPER et al., 2019).

A Criptococose é normalmente fatal se não houver tratamento efetivo (COELHO et al., 2014). A Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA) aconselha como tratamento efetivo anfotericina B (AMB) em combinação com 5-fluorocitosina (5-FC) nas primeiras duas semanas de tratamento, posteriormente a continuidade do tratamento é com fluconazol (FLZ) (PERFECT et al., 2010).

Em humanos a infecção por *Cryptococcus* spp ocorre por inalação de leveduras ou esporos que atingem os pulmões, especificamente os alvéolos, nos quais pode ocorrer infecção pulmonar, podendo evoluir para meningoencefalite dependendo do estado imunológico do hospedeiro (LIN; HEITMAN, 2006; KHAWCHAROENPORN et al., 2007; HARRIS et al., 2013; COELHO et al., 2014).

A colonização fúngica e a progressão da doença são determinadas por três fatores principais: 1) resposta imune do paciente; 2) virulência da cepa desta levedura e 3) quantidade de partículas infectantes inalada pelo hospedeiro (PERFECT et al., 2010).

A patogênese da forma grave da criptococose apresenta sinais e sintomas

relativos ao envolvimento das meninges e aumento da pressão intracraniana gerada pela infecção. Tais como: febre, dor de cabeça, desorientação, vertigem, rigidez na nuca, tontura, hiporreflexia, sonolência, vômitos, afasia e paralisia dos nervos cranianos. (LACAZ, 2002).

Ambas as espécies de *Cryptococcus* demonstram diferenças nas manifestações clínicas, enquanto a infecção por *C. neoformans* pode apresentar lesões relacionadas à pneumonia multifocal, meningite e meningoencefalite, nas infecções por *C. gattii* podemos observar manifestações clínicas ligadas a formas pulmonares graves com presença de lesões focais e criptococomas que são massas fúngicas no pulmão e no cérebro. Esses criptococomas podem dificultar o acesso dos fármacos ao sítio da infecção, conseqüentemente podendo prolongar o tratamento. Nestes casos a intervenção cirúrgica para retirada desses criptococomas pode ser indicada. (CHEN *et al.*, 2000; JAIN *et al.*, 2005; DIXIT *et al.*, 2009; SEVERO *et al.*, 2009; GALANIS *et al.*, 2010).

Ao chegar aos alvéolos pulmonares o fungo interage com células do sistema imune. Essa interação resulta no recrutamento de células para o sítio de infecção, que liberam citocinas inflamatórias importantes para a resposta adequada pelo hospedeiro. Pode ocorrer o desenvolvimento de três vias específicas que vão determinar a eficiência na proteção do indivíduo ou o início da manifestação da doença. (PERFECT; CASADEVALL, 2002; PERFECT, 2010; SABIIT; MAY, 2012) Tais como:

- 1) Em indivíduos com resposta imune não competente ocorre proliferação e disseminação do fungo causando a doença pulmonar que apresenta nódulos pulmonares e/ou inflamação e doença disseminada com maior frequência no cérebro;

- 2) Não desenvolvimento da doença com eliminação completa do fungo diante de uma resposta imune eficaz;

- 3) Infecção sem sintomas quando o fungo apesar de não eliminado entra em estado de latência no organismo, normalmente isolado em granulomas.

Nessa última situação, o fungo permanece dormente e o hospedeiro sem sintomatologia até que o hospedeiro apresente uma baixa na resposta imune ou total supressão de uma resposta eficiente, levando a reativação, replicação

e posterior disseminação do fungo para outros órgãos. (PERFECT; CASADEVALL, 2002; PERFECT, 2010; SABIIT; MAY, 2012).

Existem três possíveis mecanismos que explicam a disseminação do fungo do pulmão até o sistema nervoso central (SNC), causando assim a forma mais grave da doença, conhecida como meningoencefalite ou meningite criptocócica. (MA & MAY, 2009). O primeiro mecanismo que explica a disseminação do fungo para o SNC, é o popular modelo de cavalo de Tróia, no qual o fungo é fagocitado por uma célula imune e não sendo morto por ela, trafega dentro desse fagócito até a barreira hematoencefálica (BHE) chegando as meninges e causando a doença neste local. (KRONSTAD *et al.*, 2011).

O segundo mecanismo consiste na internalização do *Cryptococcus* no qual as células fagocíticas com fungos internalizados migram até o SNC e lá são capazes de transferir o fungo para células endoteliais dos capilares sanguíneos do cérebro através de um processo chamado de transferência lateral, posteriormente as células fúngicas migram e atravessam o citoplasma celular sem causar dano ao endotélio vascular, atingindo o tecido cerebral facilitando assim a colonização por esse fungo. (MA & MAY, 2009; KRONSTAD *et al.*, 2011).

No terceiro mecanismo, as células fúngica são capazes de atravessar sozinhas entre as células endoteliais do cérebro, causando a doença neste local. Este mecanismo é conhecido como modelo paracelular. (MA & MAY, 2009; SABIITI e MAY, 2012).

Grande parte da virulência e letalidade deste gênero está ligada a habilidade do fungo de evadir dos tecidos pulmonares e se disseminar pela corrente sanguínea, no qual relatos que leveduras mutantes que apresentam falhas nesse escape são capazes de promover doenças assintomáticas ou brandas (DENHAM; BROWN, 2018).

A imunidade do hospedeiro mediada por células é importante para uma resposta eficiente contra as leveduras deste fungo. Essa resposta é determinante para a não progressão da criptococose. Estudos com pacientes HIV/AIDS mostram que a depleção de linfócitos T CD4, uma das principais células do sistema imune do hospedeiro, aumenta o risco da infecção por este fungo (PONGSAI; ATAMASIRIKUL; SUNGKANUPARPH, 2010).

1.2. Epidemiologia da criptococose

Associada ao HIV, a criptococose é a principal causa de morte por infecções fúngicas em pacientes com AIDS. A criptococose é a segunda infecção fúngica com maior mortalidade no Brasil e apresenta dados clínicos consistentes com os ao redor do mundo. Em todas as regiões geográficas foram relatados casos de criptococose. Reforçando a presença global deste fungo (PRADO *et al.*, 2009).

A forma mais grave da criptococose é a meningite criptocócica. Estimativas de 2009, sugeriam que a doença afetava cerca de um milhão de pessoas portadora do HIV/AIDS, apresentando letalidade em torno de 65% e incidência de 75% de casos novos na África Subsaariana (PARK *et al.*, 2009).

Entretanto, a acessibilidade e precisão de técnicas diagnósticas que detectam infecções fúngicas, assim como protocolos otimizados para o controle da AIDS, entre eles o uso da terapia antirretroviral combinada levarão a uma diminuição significativa nos casos de mortalidade por doenças fúngicas (ALVES SOARES, 2019).

Dados mais recentes demonstraram que ocorreu uma queda no número de casos de meningite criptocócica. As estimativas mais atuais indicam que ocorrem cerca de 223 mil casos da doença associada a AIDS por ano, com 181 mil mortes, com elevação da taxa de letalidade da doença para 81%. No entanto, a taxa de incidência da doença na região da África subsaariana permanece em torno de 73% semelhante aos dados anteriores (RAJASINGHAM *et al.*, 2017).

Por ano, são diagnosticados aproximadamente 200 mil casos de meningite causados por *Cryptococcus* spp, e os tratamentos convencionais utilizados enfrentam grandes desafios devido à elevada toxicidade e limitações farmacocinéticas (AFELTRA, VERWEIJ, 2003; DAY *et al.*, 2013; JARVIS *et al.*, 2014; AGUSTINHO *et al.*, 2018).

1.3. Epidemiologia da Criptococose no Brasil

As regiões Sudeste e Sul do Brasil apresentam prevalência da criptococose associada a AIDS, causada pela espécie *C. neoformans*, com predominância do sexo masculino, com idade entre 30 a 39 anos, com letalidade de 35 a 45%. Já as infecções por *C. gattii* são casuais. A criptococose causada pela espécie *C. gattii* é endêmica nas regiões Norte (Amazônia) e Nordeste do Brasil incluído o semiárido atingindo crianças e indivíduos jovens, HIV-negativos e em menores casos ocorrendo nas demais regiões. (BRASIL, 2012).

No Brasil a letalidade gira em torno de 45% a 65% em casos de meningite, seja associada com AIDS, seja em indivíduos aparentemente normais. No DF a letalidade geral é de 51,8%, com maior percentual de casos relacionados a espécie *C. neoformans* (JÚNIOR *et al.*, 2017).

A partir do monitoramento de casos de criptococose de 2000 a 2012 diagnosticados pela Rede SUS do DF, um levantamento identificou 56 casos da doença neste período. O número não indica uma alta incidência da doença, entretanto a gravidade desta micose é elevada. Do total verificado 56,3% são oriundos do DF, 32,1% da Ride/DF e 14,3% de outros estados, e maior parte dos casos acometia homens (JÚNIOR *et al.*, 2017).

Estudo realizado por Alves Soares e colaboradores (2019), sobre mortalidade no Brasil por criptococose entre os anos 200 e 2012 demonstrou que houve registro de 5.755 óbitos no país. Destes, a criptococose foi registrada como causa básica de morte em 1.121 óbitos (19,5%), representando uma taxa média de mortalidade de 6,09/milhão de habitantes. Homens apresentaram maior óbito em relação a mulheres pela doença, prevalecendo na faixa etária de 20 a 59 anos.

Ainda de acordo com o estudo de Alves Soares e colaboradores (2019) os óbitos pela doença foram registrados em todos os estados brasileiros, mas sua distribuição não foi homogênea. A figura 3 mostra o perfil geográfico das taxas de mortalidade por criptococose entre 2000 a 2012, tanto como causa básica quanto como causa associada de óbito.

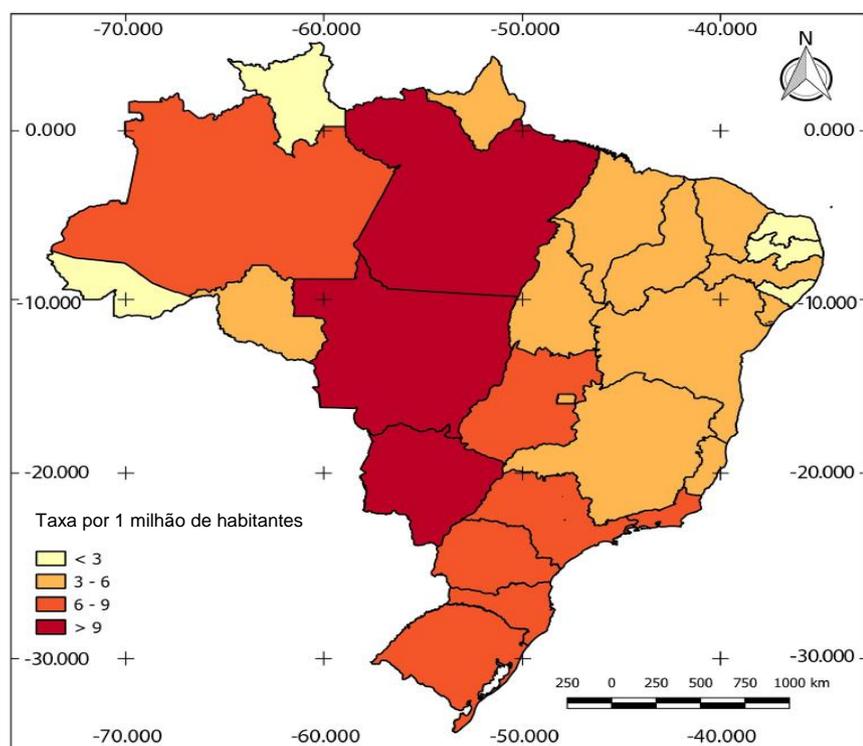


Figura 3. Taxa de letalidade associada à criptococose (causas associadas) nos estados brasileiros. Adaptada de Alves Soares *et al.*, (2019).

1.4. *Cryptococcus spp.*

Os fungos do gênero *Cryptococcus* são basidiomicetos normalmente leveduriformes (LAZERA *et al.*, 2000; LIN, 2009; LIN; HEITMAN, 2006).

O gênero *Cryptococcus* diferencia-se por apresentar leveduras encapsuladas que podem estar dispersas no ambiente, tendo como *habitat* natural lugares úmidos, contendo excretas de pássaros ou ocos de árvores (RIBAS *et al.*, 2011).

O gênero apresenta cerca de 70 espécies e atualmente duas dessas espécies são reconhecidas como patogênicas: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. A primeira inclui variação *grubii* (historicamente, sorotipo A), var. *neoformans* (historicamente, sorotipo D) e variedade híbrida AD. As espécies e variedades se diferem em aspectos

bioquímicos, biológicos, ecológicos, antigênicos e genéticos (QUEIROZ *et al.*, 2008).

A espécie *C. neoformans* está normalmente ligada a casos de imunossupressão e associação com HIV/AIDS. A espécie *C. gattii*, entretanto se associa normalmente a casos da doença em pessoas aparentemente imunocompetentes (WILSON, 1957; MITCHELL, PERFECT, 1999; CASADEVALL, PERFECT, 1998; LESTER *et al.*, 2011).

Historicamente, existia-se apenas a espécie *C. neoformans* a qual era dividida em cinco sorotipos, A (*C. neoformans* var. *grubii*), B (*C. neoformans* var. *gattii*), C (*C. neoformans* var. *gattii*), D (*C. neoformans* var. *neoformans*) e AD (um híbrido dos sorotipos A e D), com base em diferenças sorológicas derivadas da cápsula polissacarídica identificadas por testes de aglutinação (IDNURM *et al.*, 2005). No entanto essa classificação foi posteriormente substituída por Kwon-Chung e Varma (2006) que ao analisarem diferenças epidemiológicas, bioquímicas e ecológicas entre essas diferentes variedades de *C. neoformans* sugeriram uma nova classificação desse fungo separando-o em duas espécies diferentes: *C. neoformans* e *C. gattii*. Posteriormente, Meyer e colaboradores (2009), propuseram uma classificação dos fungos do complexo *Cryptococcus* spp em diferentes tipos moleculares a partir de análises filogenéticas feitas a partir do sequenciamento completo de várias linhagens das espécies-irmãs *C. neoformans* e *C. gattii*. Essa classificação compreende oito tipos moleculares: VNI, VNII e VNB; VNIV; VNIII de *C. neoformans* e VGI, VGII, VGIII e VGIV de *C. gattii*. A figura 4 demonstra a classificação dos fungos desse complexo de acordo com esses diferentes critérios conforme proposto por Lin *et al.*, 2009.

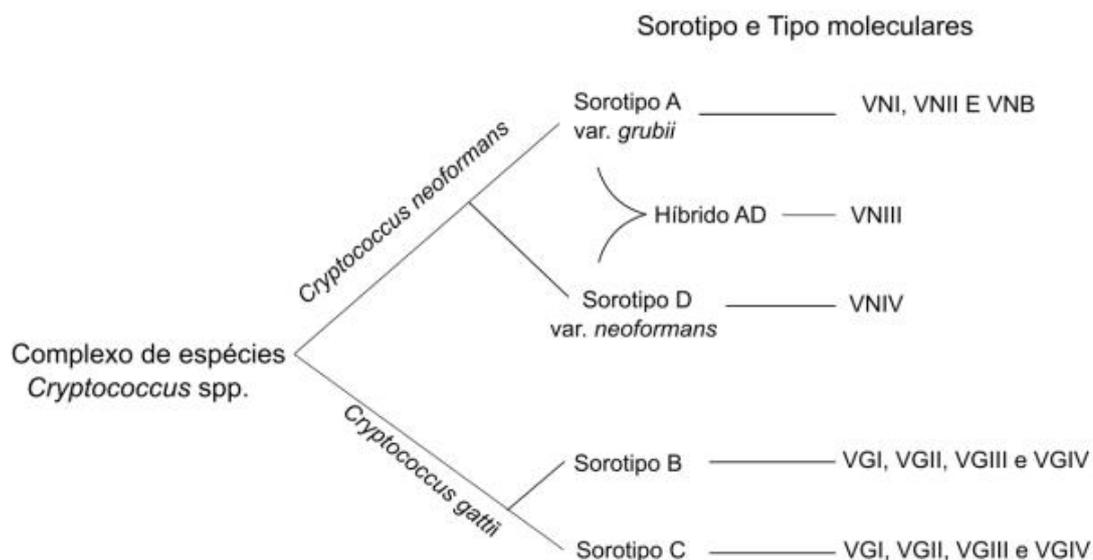


Figura 4. Classificação de espécies do gênero *Cryptococcus* em sorotipos e tipos moleculares, Adaptado de Lin, 2009.

Em 2015, Hagen e colaboradores propuseram que os fungos dos complexos *C. neoformans* e *C. gattii* fossem divididos em sete espécies de acordo com suas características fenotípicas, genotípicas, epidemiológicas e de virulência, sendo proposto o uso de *C. neoformans* para os genótipos VNI, VNII e VNB (anteriormente *C. neoformans* var. *grubii*), *C. deneoformans* para os genótipos para VNIV (anteriormente *C. neoformans* var. *neoformans*), *C. gattii* para VGI, *C. deuterogattii* para VGII, *C. bacillisporus* para VGIII e finalmente *C. tetragattii* para VGIV. Apesar da proposta destes autores, essa nova nomenclatura taxonômica ainda não é amplamente aceita por muitos grupos e a classificação em complexo *C. neoformans* e complexo *C. gattii* ainda é bastante utilizada.

De acordo com Firacative e colaboradores (2018), a maior prevalência global e na América latina, principalmente no Brasil são de isolados clínicos e ambientais com classificação *Cryptococcus* var. *grubii* (sorotipo A e tipo molecular VNI).

O *Cryptococcus* spp é um basidiomiceto que apresenta ampla distribuição geográfica, e pode ser encontrado no solo, troncos de árvores, vegetais em processo de decomposição e em excreta de aves, principalmente de pombos

(LAZERA *et al.*, 2000; LIN, 2009; LIN; HEITMAN, 2006).

Segundo May *et al.*, 2016 em relação a morfologia fúngica do *Cryptococcus* após a infecção se estes forem derivados de esporos ou células de levedura, por inalação em um hospedeiro mamífero todos os *Cryptococcus* passam ou mantêm uma forma de levedura. Quando cultivado em certas condições em laboratório, o *Cryptococcus* passa a possuir células que são redondas e têm em geral de 5 a 7 µm de diâmetro. Contudo, o tamanho, a estrutura e as características das células podem variar drasticamente dentro do hospedeiro.

Uma morfologia atípica importante de células de *Cryptococcus* são as células titãs. As células titãs possuem um diâmetro do corpo celular superior a 12 µm (excluindo a cápsula), são poliploides, possuem cápsulas altamente reticuladas e uma parede celular espessada. Estudos recentes mostraram que as células titãs contêm níveis elevados de quitina na sua parede celular. Esse polissacarídeo é reconhecido e clivado por quitinases hospedeiras, e pode induzir uma resposta imune adaptativa prejudicial. Curiosamente, a poliploidia observado em células titãs melhora a adaptação genética a um ambiente hostil estressante, resultando em aumento da sobrevivência dentro do hospedeiro (MAY *et al.*, 2016).

De acordo com Sorrell e Ellis (1997), a espécie *C. gattii* foi inicialmente isolada de uma árvore chamada *Eucalyptus camaldulensis* na região sul da Austrália. No Brasil o *C. gattii* já foi encontrado em oco de árvores das espécies *Syzygium jambolana*, *Cassia grandis*, *Senna multijuca* e *Ficus microcarpa* (LAZERA *et al.*, 1993; 1998; FORTES *et al.*, 2001; COSTA *et al.*, 2009).

Kwon-Chung e Bennett (1984) consideravam o *C. gattii* um patógeno tropical e subtropical, no entanto casos da infecção por esta espécie em humanos em Vancouver no Canadá, e conseqüentemente sua disseminação a região dos Estados Unidos e British Columbia, Espanha, Itália e Grécia derrubou esse padrão (DROMER *et al.*, 1996; KIDD *et al.*, 2007; BYRNES *et al.*, 2009; LOCKHART *et al.*, 2013).

1.5. Atributos de virulência do *Cryptococcus* spp

São diversos os fatores de virulência do *C. neoformans*, dentre esses os mais estudados são a cápsula polissacarídica, a produção de melanina e capacidade de crescimento a 37°C (SABIITY; MAY, 2002).

No geral, a maior parte das espécies de fungos apresenta um ótimo crescimento entre 25 e 35°C. Somente alguns fungos possuem termotolerância, que consiste na habilidade de crescer entre 35 e 40°C. Essa particularidade é um pré-requisito para que um microrganismo seja capaz de proliferar e provocar doença em tecidos internos de hospedeiros mamíferos (PERFECT, 2006).

Em relação à cápsula que envolve a superfície celular de *C. neoformans*, esta é tida como o principal fator de virulência de *C. neoformans* e *C. gattii* (Zaragoza *et al.*, 2009). Sua importância foi comprovada quando mutantes que possuem defeitos na formação capsular se mostraram avirulentos em modelo murino de infecção (Chang e Kwon-Chung, 1994; Zaragoza *et al.*, 2008). A cápsula é composta por dois principais polissacarídeos: glicuronoxilomanana (GXM), que corresponde a aproximadamente 90% da massa total da cápsula; e glicuronoxilomanogalactana (GXMGal) (HEISS *et al.*, 2009), que corresponde a cerca de 7% dessa estrutura (DOERING, 2000). O tamanho da cápsula pode ser induzido por diversas condições, como mudanças no pH, elevados níveis de CO₂ (GRANGER *et al.*, 1985) e privação de ferro (VARTIVARIAN *et al.*, 1993).

A lacase é um importante fator de virulência do fungo, ela é expressa em *C. neoformans* como uma enzima da parede celular que possui um amplo espectro de atividade, oxidando compostos polifenólicos e ferro. Dois parálogos, CNLAC1 e CNLAC2, estão presentes no fungo, dos quais o primeiro expressa a atividade enzimática dominante em condições de privação de glicose. A regulação da enzima se dá em resposta a vários sinais ambientais, incluindo falta de nutrientes, estresse pela temperatura, e pode ser mediada por várias vias de transdução de sinal (ZHU & WILLIAMSON, 2004).

A melanina é um pigmento que pode ser encontrado em todos os reinos biológicos, desempenhando uma ampla variedade de funções, como defesa contra o estresse ambiental, à radiação ultravioleta, às radiações ionizantes e aos agentes oxidantes (EISENMAN & CASADEVALL, 2012). Este pigmento não é crucial para o desenvolvimento e morfogênese fúngica, porém está diretamente relacionada à sobrevivência e à virulência em modelos animais (WATANABE *et al.*, 2000; FENG *et al.*, 2001; SHIMIZU *et al.*, 2014). A melanina é um polímero pigmentado que apresenta coloração escura, sendo hidrofóbico e insolúvel em fluídos aquosos ou orgânicos, apresentando carga negativa e sendo resistente a ácidos (NOSANCHUK & CASADEVALL, 2006).

Grande parte dos fungos sintetizam melanina constitutivamente, outros, facultativamente, como acontece com *C. neoformans*. Em meio contendo substâncias fenólicas, como L-dopa, células de *C. neoformans* produzem e acumulam tal pigmento (WANG *et al.*, 1995). A melanização pode até mesmo alterar a resposta imune do hospedeiro à infecção, exemplo: uma linhagem mutante de *C. neoformans*, que apresenta deficiência na síntese de melanina mostrou-se menos virulenta em camundongos, enquanto células melanizadas obtiveram maior resistência à fagocitose e efeitos antifúngicos de macrófagos murinos (WANG *et al.*, 1995).

A cápsula apresenta função de proteção ao fungo no meio ambiente, evitando a desidratação, radiação, além de proteger contra predadores naturais (STEENBERGEN *et al.*, 2001; MYLONAKIS *et al.*, 2002; CHRISMAN *et al.*, 2011).

A cápsula dificulta a fagocitose pelos macrófagos no hospedeiro, em casos de fagocitose, a cápsula protege o *Cryptococcus spp* da ação espécies reativas de oxigênio (MACURA *et al.*, 2007; ZARAGOZA *et al.*, 2008). Outra ação importante que a cápsula desempenha é a modulação do sistema imune em função da sobrevivência do fungo, através da desregulação da produção de citocinas inflamatórias (KARKOWSKA-KULETA *et al.*, 2009; VECCHIARELLI *et al.*, 2011).

Uma outra característica importante do gênero *Cryptococcus* é a sua capacidade de gerar biofilmes, atributo relacionado à resistência a antifúngicos. Já é bastante conhecido que os biofilmes microbianos apresentam alta

resistência a antibióticos e outras moléculas microbicidas (ANDERSON and O'TOOLE, 2008).

Os biofilmes formados por de *C. neoformans* apresentam maior resistência a AMB (anfotericina B) e completamente resistentes aos azóis quando comparados com células planctônicas (MARTINEZ and CASADEVALI, 2006).

Outro atributo de virulência importante deste fungo é a produção de enzimas, as mais importantes são fosfolipases, proteases e a urease. As proteases são enzimas que degradam proteínas, no hospedeiro essas enzimas têm a capacidade de fazer a quebra de imunoglobulinas e proteínas do complemento. As proteases também estão relacionadas à permeabilidade da barreira da barreira hematoencefálica (CASADEVALL *et al.*, 2018).

Já as fosfolipases atuam fazendo a quebra de fosfolípidios, o fungo produz a fosfolipase B, que apresenta função de degradação de membranas de fagócitos, e auxilia no acesso de nutrientes dentro do fagolisossomo, e no processo de exocitose. Outra função das fosfolipases é facilitar a adesão do fungo as células epiteliais do pulmão, favorecendo a dispersão do fungo (COELHO *et al.*, 2014).

A urease produzida pelo fungo está relacionada à neutralização do pH dentro do fagolisossomo, invasão do SNC e também tem função de facilitar acesso a fontes de nitrogênio importantes à levedura (MAY *et al.*, 2016).

A virulência e letalidade atribuídas ao fungo estão em sua habilidade de evadir dos tecidos pulmonares e se espalhar pela corrente sanguínea, havendo relatos em que leveduras mutantes que apresentam falhas nesse escape promovem doenças assintomáticas ou brandas (DENHAM; BROWN, 2018). Assim sendo, quando este se localiza na corrente sanguínea, pode infeccionar qualquer órgão do corpo humano; já foi localizado em: adrenais, articulações, coração, cavidade ocular, linfonodos, próstata, ossos, rins e trato gastrointestinal (LIN; HEITMAN, 2006; MITCHELL; PERFECT, 1995). Todavia, o órgão pelo qual a levedura possui maior tropismo é o sistema nervoso central. O motivo para este tropismo ainda não é totalmente esclarecido, entretanto existem prováveis explicações para este fenômeno, como por exemplo: a presença de substâncias preferenciais para o crescimento do

fungo; a construção de um refúgio para o fungo evitar uma resposta imune eficiente do hospedeiro e/ou a presença de receptores mais específicos que em outros órgãos, que atraíam fungo (LIN; HEITMAN, 2006).

1.6. Imunologia da criptococose

As leveduras do gênero *Cryptococcus* são capazes de interagir com o sistema imune do hospedeiro. Uma das descobertas mais notáveis dos últimos anos tem sido até que ponto os *Cryptococcus* spp podem manipular a resposta imune do hospedeiro para atenuar a inflamação, evitar a morte por células fagocíticas e, finalmente, se disseminar para o Sistema Nervoso Central (MAY *et al.*,2016).

As células dendríticas (DCs) são descritas como as primeiras células das linhas de defesa imunológica a agir no reconhecimento e internalização do *Cryptococcus* no pulmão do hospedeiro. Estas células são importantes na ativação de resposta imune adaptativa, pois tem capacidade de apresentar antígenos que ativam linfócitos T específicos contra antígenos do fungo. As DCs apresentam a habilidade de eliminar leveduras fagocitadas por meio de seu conteúdo lisossomal, mesmo em hospedeiros que apresentam susceptibilidade a criptococose (GIBSON; JOHNSTON, 2015).

Os macrófagos assim com as DCs, citadas anteriormente, apresentam papel importante na resposta contra a criptococose, principalmente os macrófagos alveolares que são considerados primordiais para uma resposta eficiente (GORDON & READ, 2002; GIBSON; JOHNSTON, 2015). Apesar dos macrófagos sabidamente serem considerados as principais células efetoras contra o fungo causador da criptococose, em vários estudos, tais como os realizados em 2001, por Feldmesser, Toker e Casadevall, observou-se que o *C. neoformans* é uma patógeno facultativo de macrófagos, sendo ao mesmo tempo a principal célula efetora na resposta imune à esse fungo, mas também um sitio de replicação celular e provavelmente dispersão do fungo nos tecidos do hospedeiro.

A depleção de macrófagos estava fortemente ligada à redução da disseminação fúngica para o cérebro de camundongos, já que para que ocorra o transporte do fungo ele precisa ser internalizado pelos fagócitos (MONGA, 1981).

Diversos autores descrevem a capacidade de plasticidade de polarização dos macrófagos alveolares, que se caracterizam pela presença e liberação de citocinas inflamatórias (Figura 5). A indução de produção e liberação de IFN- γ no microambiente leva a uma polarização de macrófagos conhecidos como clássicos ou M1 que são considerados eficientes contra a espécie *C. neoformans*, em contrapartida a indução de produção e liberação de IL-4 e IL-13 que leva a uma polarização aos macrófagos conhecidos como M2 ou macrófagos alternativos que não são eficientes contra *C. neoformans*. Esta polarização pode facilmente ser mudada de acordo com as concentrações das citocinas citadas anteriormente (DING *et al.*, 1988 ; ARORA *et al.*, 2005; PORCHERAY *et al.*, 2005 ; STOUT *et al.*, 2005; MOSSER; EDWARDS, 2008 ; DAVIS *et al.*, 2013; HUSSELL; BELL, 2014).

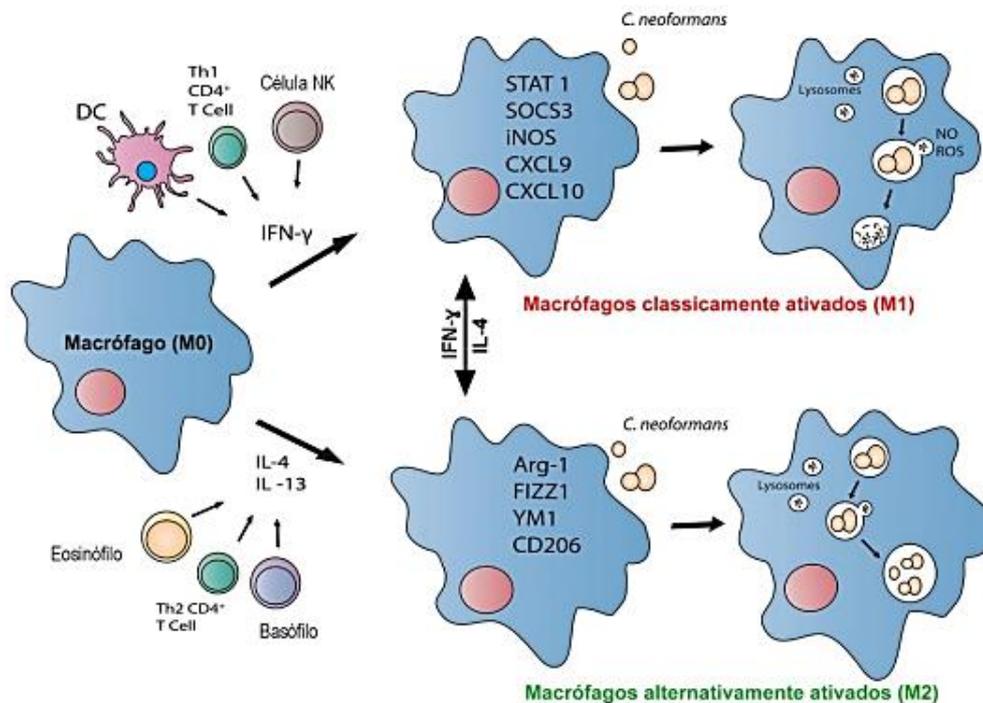


Figura 5. Plasticidade fenotípica dos macrófagos em interação com *Cryptococcus*. Adaptado de Wager e Wormley (2015).

Após interação do fungo com os macrófagos alveolares ocorre uma reação inflamatória granulomatosa com liberação das citocinas fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina 12 (IL-12), interleucina 18 (IL-18) e interferon gama (IFN- γ), mediada por linfócitos T helper (CD4) e linfócitos T citotóxicos (CD8), células natural killer (NK), neutrófilos, eosinófilos como resposta a levedura (Figura 6) (PASA, 2011).

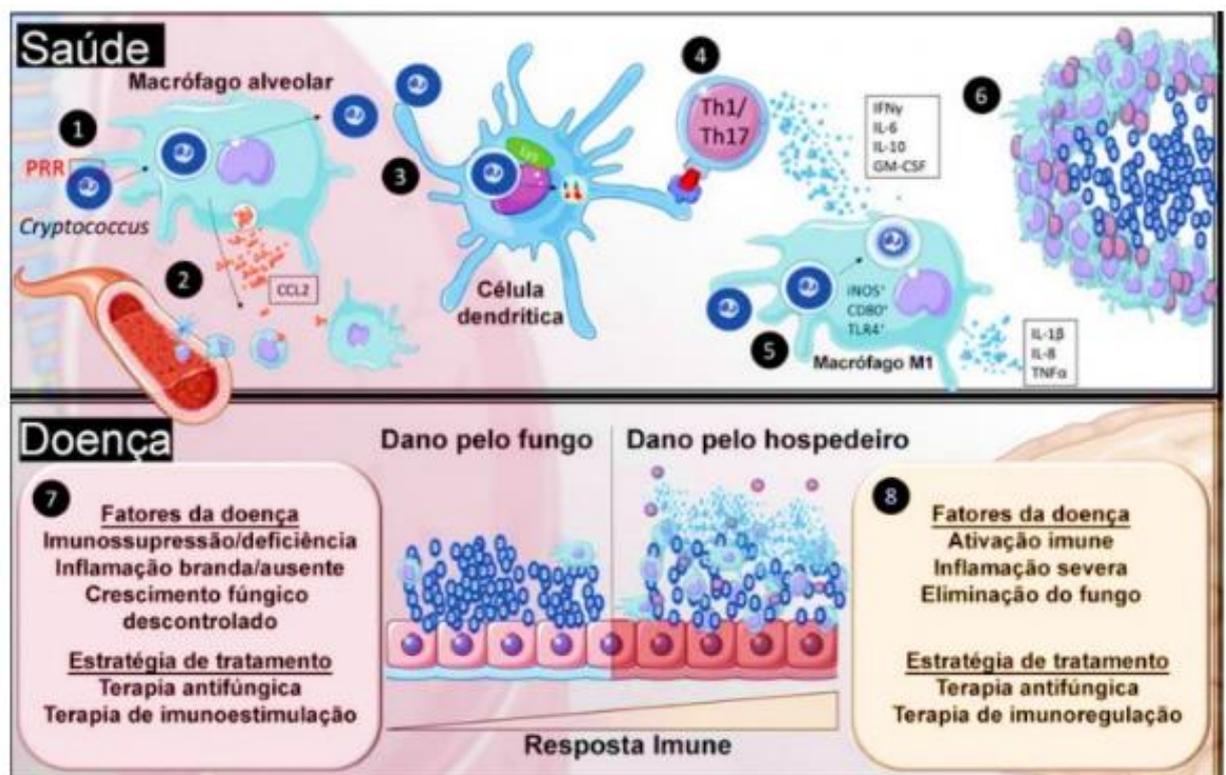


Figura 6. Resposta imune a *Cryptococcus*. Adaptado de Elsegeiny e colaboradores (2018).

Os neutrófilos também possuem capacidade fungicida frente ao *C. neoformans*, principalmente a partir da produção de espécies reativas de oxigênio (SUN *et al.*, 2016). Apesar de apresentarem importância em sítios específicos durante a infecção disseminada (SUN *et al.*, 2016), estas células não são consideradas essenciais durante a patogênese, sendo um aumento na quantidade dessas células em determinados tecidos relacionado à piora no quadro clínico do hospedeiro (OSTERHOLZER *et al.*, 2009).

Os linfócitos TCD4 também apresentam importância na defesa do organismo contra a criptococose, pois são eles que recrutam e ativam os macrófagos para eliminação desse fungo do organismo (CROWE *et al.*, 1991; HUFFNAGLE *et al.*, 1994).

Os linfócitos TCD8 também desempenham um papel importante na resposta imune do hospedeiro a *C. neoformans*. Estas células medeiam a morte de *C. neoformans* (MA *et al.*, 2002). A depleção *in vivo* de linfócitos TCD8 murinos reduziu a sobrevivência em um modelo de infecção criptocócica letal (MODYET *et al.*, 1994). As células TCD8 também limitam o crescimento e a sobrevivência de *C. neoformans* em macrófagos por meio da produção de IFN- γ independente dos linfócitos TCD4 (LINDELL *et al.*, 2005).

O fungo é capaz de interagir e modular as respostas do hospedeiro, e de maneira geral induz a resposta não protetora Th2 por meio da expressão de fatores de virulência como urease e lacase (OSTERHOLZER *et al.*, 2009; Coelho *et al.*, 2015).

Entretanto, o que é relatado pela literatura é que a presença concomitante de elementos da resposta Th2 seja conveniente no curso da doença ao contrabalancear uma resposta Th1 excessiva (COELHO *et al.*, 2014; GRAHNERT *et al.*, 2014).

Portanto, a resposta imune na criptococose é complexa havendo balanço entre Th1/Th2, com descrições mais recentes da participação de outras respostas como a Th17. A resposta Th17 é mediada pela produção IL-17 em resposta a outras como IL-1 β , IL-6, TGF β e IL-23, e contribui para o controle da carga fúngica, assim como a resposta Th1 (ZHANG *et al.*, 2009; WOZNIAK *et al.*, 2011).

Nesse trabalho analisamos a interação de diferentes isolados clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii* com macrófagos murinos, observamos e estudamos a diferença entre as espécies, e correlacionamos os dados obtidos das espécies com os fenótipos examinados da interação com os fagócitos.

2. Pergunta da pesquisa

- 1) Existem diferenças fenotípicas relacionadas à espécie fúngica na interação *in vitro* de isolados *C. neoformans* e *C. gattii* com macrófagos**

murinos que se assemelham a manifestação clínica da doença entre cada espécie?

3. Justificativa

Sabendo que a criptococose é uma doença cosmopolita grave que apresenta maior impacto em países em desenvolvimento pela dificuldade do acesso ao diagnóstico, tratamento e a mortalidade e morbidade relacionada a doença é significativa em pacientes imunodeprimidos (WHO, 2018). Estudos que elucidem as diferenças na interação de macrófagos entre isolados das espécies *C. neoformans* e *C. gattii* são importantes já que não foram claramente investigadas as variantes presentes aqui no Brasil.

Devido essa temática foi criada a Rede de Criptococose Brasileira (RBC). Essa rede é composta por diversos pesquisadores e centros de pesquisa. Este trabalho faz parte de um projeto maior sobre caracterização de centenas de isolados clínicos coletados e obtidos no país. Diversos fenótipos são avaliados por diversos pesquisadores dentre eles produção de cápsula polissacarídica, melanina, vesículas extracelulares, interação com *Galleria mellonella*, caracterização molecular e a interação com macrófagos murinos objetivo deste trabalho. O objetivo é caracterizar fenotipicamente os isolados clínicos provenientes de pacientes com criptococose a fim de não só entendermos a dinâmica da doença mas também estabelecermos possíveis associações entre fenótipos do fungo com a apresentação clínica da doença.

O papel do macrófago na eliminação do fungo é determinante para o curso da doença, por isso, entender melhor sua interação, com o fungo e entre espécies, poderá nos ajudar a entender possíveis diferenças na virulência de cada espécie ou apresentação clínica da doença causada por elas. Por exemplo, por que algumas linhagens são capazes de causar manifestações mais graves, enquanto outras são facilmente eliminadas?

E assim, de alguma maneira facilitar no desenvolvimento de soluções que favorecem o diagnóstico, tratamento e a prevenção dessa doença.

4. Objetivos da Pesquisa

4.1 Objetivo Geral

Caracterizar diferenças na interação de isolados clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii* *in vitro* com macrófagos murinos correlacionando esses dados com os fatores de virulência dos isolados observados na interação com os macrófagos entre as duas espécies fúngicas.

4.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o percentual fagocítico das interações *in vitro* de macrófagos murinos com isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.
- Caracterizar sobrevivência fúngica após interação *in vitro* com macrófagos murinos.
- Dosar a produção de citocinas e quimiocinas produzidas por macrófagos murinos após a interação com os diferentes isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.
- Analisar possíveis diferenças na interação de isolados clínicos isolados *C. neoformans* e *C. gattii* (taxa de fagocitose, sobrevivência fúngica, indução da produção de citocinas por macrófagos).

5. Metodologia

5.1 Cultura e diferenciação dos macrófagos murinos derivados de medula de Balb/C

Para o desenvolvimento deste trabalho utilizamos camundongos fêmeas de 4 a 12 semanas mantidas no Biotério do Instituto de Ciências biológicas (IB) da Universidade de Brasília campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, durante os experimentos realizados, eram eutanasiadas 2 fêmeas para a obtenção da

quantidade de células necessárias para cada conjunto de experimentos. Todas as etapas dos testes com os animais foram autorizadas pelo Comitê de Ética de uso de animais (UnBDOC nº 52657/2011). Verificar documento comprobatório no subitem Anexo 2 página 70.

A eutanásia dos camundongos era feita em estufa de CO₂, após a eutanásia o fêmur e tíbia dos animais eram extraídos e a medula dos ossos do fêmur e tíbia dos camundongos era coletada de acordo com o método descrito por Lutz *et al.* (1999).

Para a cultura dessas células utilizávamos meio RPMI 1640 acrescido de HEPES (25µM), bicarbonato de sódio (2g/L), gentamicina (50mg) e 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado, acrescidos 50µM de 2-mecaptoethanol e 20µg/mL de GM-CSF (fator estimulante de colônias granulocíticas e macrófagos) (Lutz *et al.*, 1999).

Após os 8 dias de cultura e suplementação conforme orientado pelo método de Lutz (1999), macrófagos murinos primários diferenciados foram utilizados nas interações com os isolados estudados. Para análise de fagocitose 4×10^6 células/mL, para análise de UFC e ELISA 5×10^5 células/mL. Todas as etapas descritas são elucidadas na Figura 7.



Figura 7. Esquema representativo de preparação de macrófagos derivados de medula. 1) fêmeas de camundongos Balb/c de 4 a 12 semanas foram utilizadas. 2) fêmures e tíbias foram coletados, 3) as células da medula foram coletadas a partir da lavagem do interior dos ossos com meio RPMI, após a extração da medula, as células foram cultivadas em placa de Petri de 20 com meio contendo 90% de RPMI, 10% de soro fetal bovino e 20µg/mL de GM-CSF

e 50µM de 2-mecaptoethanol, 4) placa contendo as células foi mantida em estufa 37°C com 5% de CO₂.

5.2 Isolados clínicos utilizados e cultura dos espécimes para os ensaios

Para o desenvolvimento desse trabalho foram utilizados um total de 40 isolados clínicos nos quais 16 linhagens clínicas de *C. neoformans* e 12 linhagens de *C. gattii* foram da FIOCRUZ do Rio de Janeiro, 10 isolados LACEN de Brasília-DF, e como controles as linhagens H99 e B3501, a coleta e estudo todas as amostras tiveram aprovação do comitê de ética e pesquisa em Ciências da Saúde (CEP_FEPECS). Os pacientes e/ou responsáveis legais deram consentimento por escrito para a coleta da amostra e dados clínicos (Anexo 1 e anexo 2).

Para manutenção das amostras, os espécimes eram acondicionados em criotubos no freezer -80°C em um estoque específico. Antes da realização dos experimentos semeamos cada amostra em meio Sabouraud (SAB) sólido (10g/L de peptona, D-Glucose 40g/L, Agar 12g/L), que após o crescimento das colônias em estufa 30°, em torno de 2 a 3 dias, eram isoladas colônias para crescimento em meio Sabouraud líquido (10g/L de peptona, D-Glucose 40g/L) na estufa 37°C/150 RPM por 24h. Após as 24h de crescimento, todas as amostras foram centrifugadas e lavadas 3x em PBS, e a cada lavagem o sobrenadante era descartado para eliminar qualquer resquício do meio de crescimento. Os isolados foram contados em câmara de Neubauer.

Após as contagens foram feitos ajustes para densidade celular necessária para cada análise feita. Após o ajuste da densidade das suspensões de células fúngicas, as leveduras eram sensibilizadas com 10 µg/mL do anticorpo-anticápsula monoclonal 18B7 como opsonina. Para os testes de fagocitose foram semeados 8x10⁶ células/mL, para UFC 10⁵ e para os testes de dosagem de citocina por ELISA 10⁶ células/mL (Figura 8).

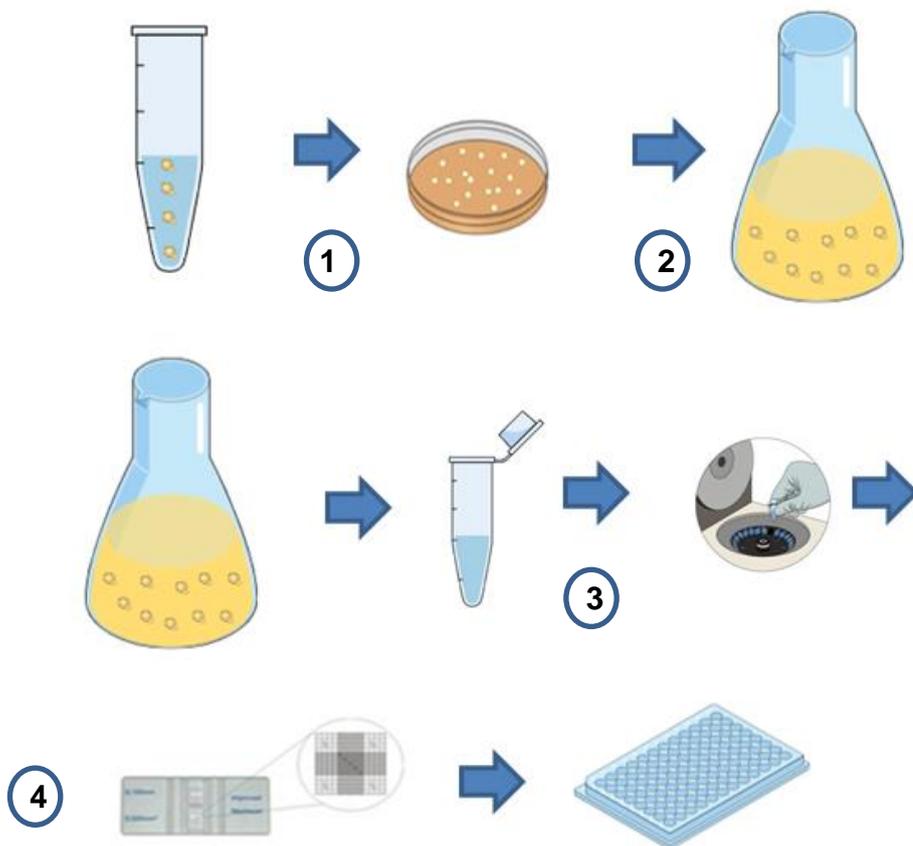


Figura 8. Esquema representativo do preparo das leveduras dos isolados clínicos de *Cryptococcus* spp para os experimentos de interação com macrófagos. 1) Crescimento de células de cada isolado em placas de meio SAB sólido por 2 – 3 dias em estufa a 30 °C 2) Inóculo de uma colônia isolada de cada isolado em meio Sabouraud líquido e crescimento a 37°C por 24h. 3) Lavagem e centrifugação das amostras em PBS 4) Contagem das células em câmara de Neubauer e diluição para as densidades celulares apropriadas.

5.3 Cultura de J774

Os macrófagos J774 que são células imortalizadas derivados de tumor reticular de ascite de camundongos fêmeas adultas Balb/c eram mantidas em freezer -80°C.

Para o cultivo as células eram descongeladas com meio DMEM aquecido a 37°C, a suspensão de células era centrifugada a 300 g por 5 minutos, contada em câmara de Neubauer e cerca de 2×10^6 células eram inoculadas por placas de cultura, e cultivadas em meio contendo DMEM 90% e soro fetal bovino 10% e 1x da solução de aminoácidos não essenciais cujo estoque é 100x. As placas de cultura contendo os macrófagos eram mantidas em estufa 37° com 5% de CO₂ para multiplicação dos fagócitos.

Repiques a cada dois dias eram feitos para favorecer a multiplicação e viabilidades das células. Após os repiques as células eram contadas, ajustadas para densidade necessária para cada experimento e plaqueadas.

Este tipo celular foi utilizado para as interações com os isolados do LACEN de Brasília.

5.4 Interação com macrófagos murinos: análise de fagocitose e índice fagocítico

A primeira análise que realizada da interação dos macrófagos murinos com os isolados clínicos de *Cryptococcus* spp foi o teste de fagocitose.

Para tal, como descrito anteriormente foi semeado 4×10^5 macrófagos por poço em placas de 24 poços em um volume de 500µL total e incubados por 24h para adesão dos macrófagos ao fundo da placa. Após esse período os macrófagos eram infectados com uma suspensão de células fúngicas previamente opsonizadas em um MOI de 2 e as células eram co-incubados por 2h em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após o período, os sobrenadantes eram de cada interação eram descartado e as células de cada poço foram coradas com kit panótico e observadas no microscópio invertido Zeiss Axio-observer Z1

(Zeiss). Fotos das diversas interações foram registradas para a contagem de percentual fagocítico da interação macrófago-fungo. Para atribuição do percentual de fagocitose, pelo menos cem células eram contadas, e quantidade dessas 100 células com fungo internalizado referia-se ao percentual de fagocitose. Para o cálculo do índice fagocítico era considerado o número de fungos dentro dos macrófagos/ número de macrófagos com fungos internalizados. O experimento foi feito em triplicata técnica e biológica. (Figura 9).

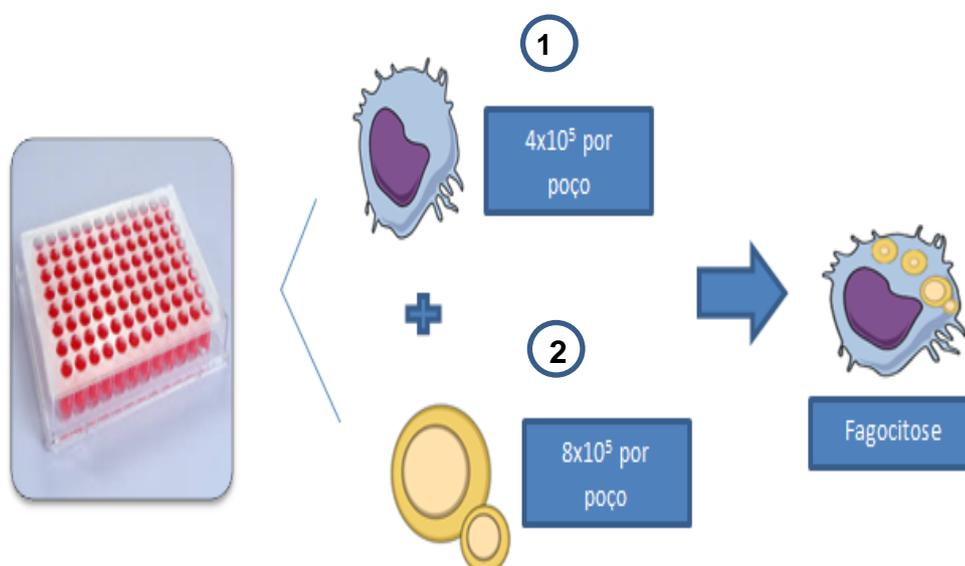


Figura 9. Esquema representativo do ensaio de fagocitose. 1) Semeio na placa de 96 poços da densidade de 4×10^5 por poço de macrófagos murinos; 2) Após 24h semeia-se 8×10^5 células de cada isolado previamente opsonizadas com anticorpo 18b7 no poço correspondente, para interação por 2h para análise de fagocitose.

5.5 Interação com macrófagos murinos: ensaio de morte fúngica (UFC)

Ao término das 24h de incubação o sobrenadante de 200 μ L da cultura contendo os fungos não internalizados foi recolhido e armazenado em microtubos de 1,5 mL. Cada poço foi lavado 1x com PBS estéril, com 200 μ L.

após isso, os macrófagos foram lisados com 200 μ L água estéril gelada seguindo-se incubação por 20 minutos para liberação de leveduras que foram fagocitadas. O produto do lisado foi adicionado ao tubo correspondente já contendo 200 μ L do sobrenadante e mais 200 μ L da lavagem com PBS, perfazendo 600 μ L de amostra. Após isso mais duas lavagens com PBS 1x foram realizadas obtendo-se um volume total de 1 mL de amostra por poço. Foram feitas diluições de 1:10 e 1:100 de cada suspensão de 1 mL das amostras de cada poço, que foram semeadas em placas de petri contendo meio ágar Sabouraud dextrose sólido. Cada microtubo de diluição também continha o total de 1 mL de suspensão. Foi semeado 100 μ L de cada diluição dos tubos de 1 mL de suspensão. Foi mantido em estufa a 30°C cada placa por um período de 2 a 3 dias, para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Os experimentos foram realizados em triplicata técnica e biológica. A análise feita no gráfico de sobrevivência se refere ao número de colônias contadas em cada placa após crescimento por 2-3 dias, multiplicado pela diluição e a quantidade pipetada na placa 100 μ L (10% da solução total de 1 mL de cada isolado), e finalmente dividido pelo inóculo inicial de 10^5 células fúngicas. Exemplo: 50 (colônias contadas) x 100 (diluição) x 10 (100 μ L pipetados que perfazem 10% da suspensão total de 1 mL) /100.000= 0,5.

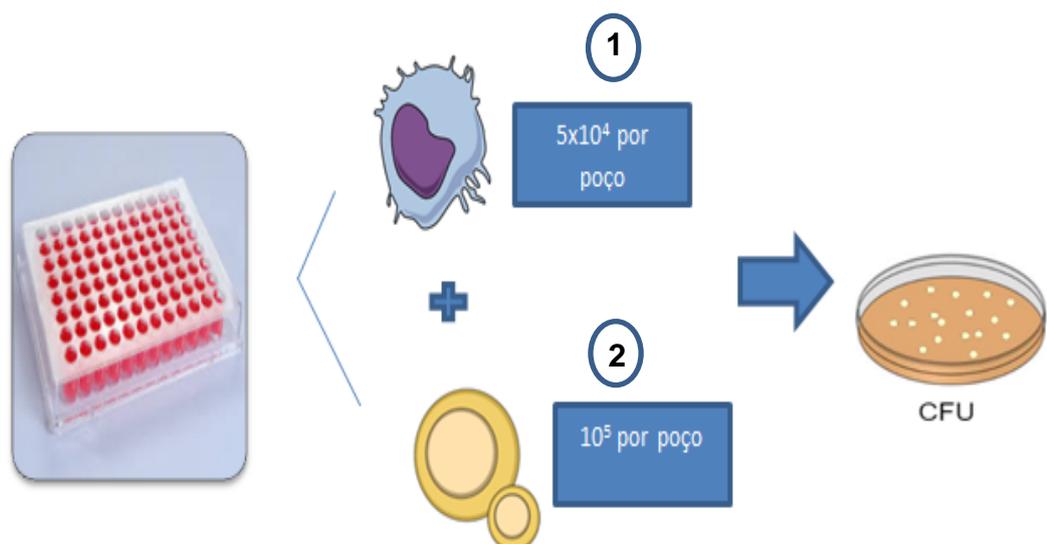


Figura 10. Esquema representativo do ensaio de sobrevivência fúngica. 1) Pipetagem na placa de 96 poços da densidade de 5×10^4 por poço de macrófagos murinos; 2) Após 24h os macrófagos foram infectados com 10^5

células de cada isolado fúngico (previamente opsonizadas com anticorpo 18B7) no poço correspondente, para interação por 24h para análise de sobrevivência fúngica.

5.6 Interação com macrófagos murinos: ensaio de produção de citocinas por ELISA

Os sobrenadantes resultantes das interações de 24h em placa de 96 poços com 5×10^4 de macrófagos com as linhagens fúngicas em um MOI de 10 foram armazenados no freezer -80°C . Descongelamos em gelo previamente cada amostra e utilizados para a dosagem da concentração de Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL) 6, e MCP-1 (CCL2) por ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) utilizando-se os kits DuoSet respectivos da R&D systems. Seguimos as recomendações do fabricante, portanto os testes foram realizados em três dias consecutivos, iniciando com a sensibilização da placa com anticorpo de captura no primeiro dia, no segundo dia realizamos bloqueio e aplicação da amostra após 24h, já ao terceiro dia aplicamos anticorpo de detecção, estreptoavidina, substrato e solução de parada. Utilizamos uma solução de lavagem constituída por PBS 1X e TWEEN-20 a 0,05% entre uma incubação e outra. As placas ao final do procedimento foram lidas em espectrofotômetro Eon ThermoStat Microplate Spectrophotometer (Biotek, Vermont EUA) no comprimento de onda de 450 nm (Figura 11).

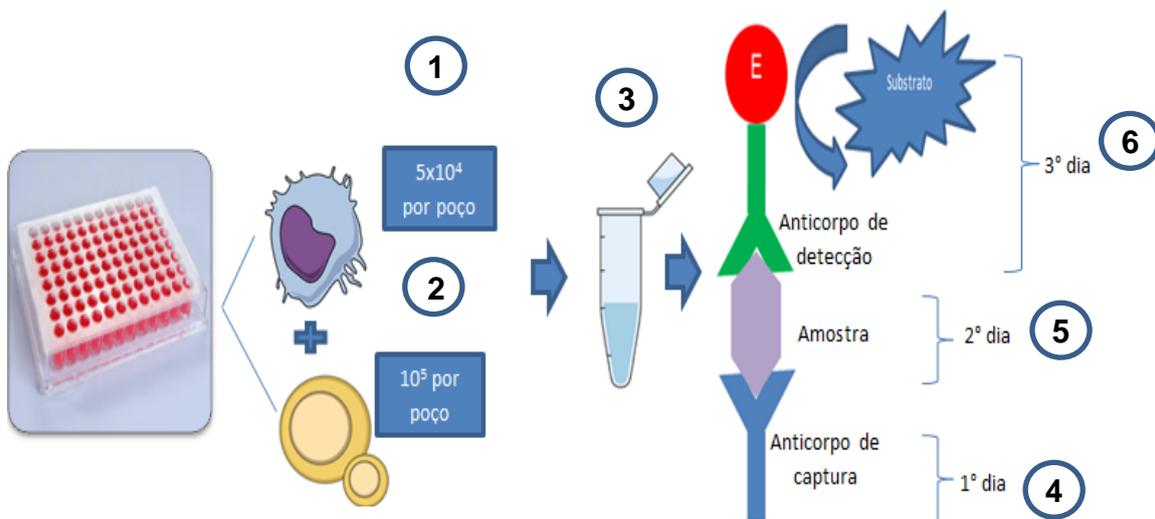


Figura 11. Esquema representativo do ensaio de dosagem de citocinas por Elisa. 1) Semeio na placa de 96 poços da densidade de 5×10^4 por poço de macrófagos murinos; 2) Após 24h aplica-se 10^5 de cada isolado opsonizado com anticorpo 18b7 no poço correspondente, para interação por 24h para análise de indução de produção de citocinas; 3) Sobrenadante da interação de 24h foi acondicionado em microtubos 500 μ l. 4) A placa para realização do Elisa foi sensibilizada no primeiro dia com anticorpo de captura; 5) No segundo dia foi adicionada a amostra proveniente do sobrenadante de cada isolado; 6) no terceiro dia foi adicionado a placa o anticorpo de captura, seguido pela estreptoavidina e posteriormente o substrato.

5.7 Análise estatística

Todos os experimentos realizados nesse estudo foram feitos em triplicata técnica e biológica. As análises estatísticas foram realizadas software GraphPad Prism, versão 6.0 (GraphPad Software). Dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

O teste Mann-Whitney foi utilizado para avaliação estatística de comparação das análises, para análise das médias de fagocitose, sobrevivência fúngica e produção de citocinas entre espécies.

Para testar a correlação entre os isolados e seus fatores de virulência foi utilizado a análise de regressão linear (r) através do coeficiente de Pearson.

6. Resultados

6.1. Diferenças nas resultantes da interação com macrófagos entre solados clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii*: taxa de fagocitose, índice fagocítico, sobrevivência fúngica e produção de citocinas inflamatórias

A princípio é apresentado os dados descritivos através de histogramas de distribuição, e posteriormente seguimos com as análises entre espécies, padronizamos uma nomenclatura específica que pode ser melhor compreendida no Anexo 3, tanto que alguns dos dados das interações com macrófagos dos isolados da Rede de Criptococose (RBC), foram parcialmente usados no artigo de umas das colaboradoras das análises de fenótipos sobre isolados da RBC (FRAZÃO *et al.*, 2020). As análises de percentual de fagocitose, sobrevivência fúngica e produção de citocinas dos 16 isolados e os 2 controles de *C. neoformans* foram realizadas ainda durante o mestrado, as análises com os 12 isolados de *C. gattii* da FIOCRUZ do Rio de Janeiro com macrófagos murinos derivados de medula e as análises com os 10 isolados mais o controle H99 com J774 e as análises entre espécies, foram feitas durante o meu doutorado.

Os isolados de *C. neoformans* da FIOCRUZ do Rio de Janeiro apresentam classificação molecular VNI e os isolados de *C. gattii* FIOCRUZ do Rio de Janeiro VGII. Não temos ainda dados da classificação molecular dos isolados de do LACEN de Brasília.

A taxa de fagocitose dos isolados clínicos de *C. neoformans* da FIOCRUZ do Rio de Janeiro apresentou intervalo de variação de 35 a 80%, conforme podemos observar na figura 12. Sendo que o maior número de

isolados apresentou uma taxa de internalização de 55%, com 5 isolados, enquanto os demais percentuais de variação apresentam somente de 1 a 2 isolados com o mesmo valor. O isolado CNF004 apresentou o menor percentual de fagocitose observado (35%), enquanto o isolado CNF014.1 apresentou o maior percentual de fagocitose (80%) (Anexo 3).

Já o intervalo do percentual de fagocitose dos isolados clínicos de *C. gattii* apresentou variação de 55 a 80%. Com o isolado CGF003 apresentando o menor percentual (55%) e o isolado CNF012 com maior percentual (80%) (Figura 12B). O percentual de variação de 68 a 70% que demonstrou maior número de isolados com essa taxa, comparados aos demais percentuais que apresentaram somente 1 isolado por percentual (Anexo 3).

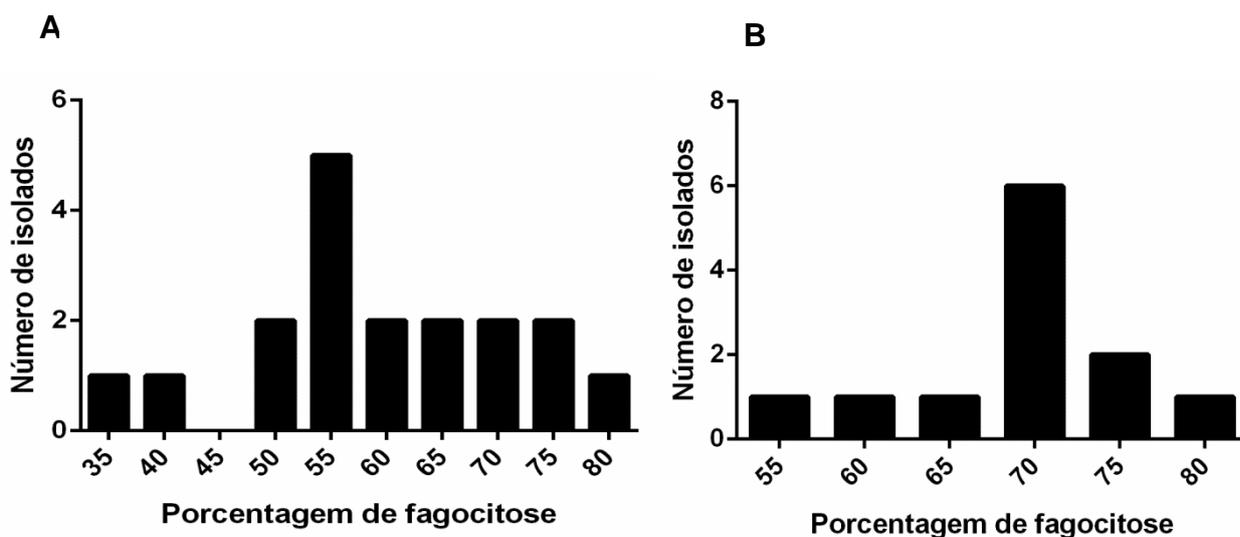


Figura 12. Histograma descritivo do percentual de fagocitose dos diferentes isolados clínicos de *Cryptococcus* spp por macrófagos. (A) Dados referentes a fagocitose das 16 linhagens clínicas de *C. neoformans* da FIOCRUZ do Rio de Janeiro e 2 controles de *C. neoformans* (H99 e B3501) (B) Dados referentes a fagocitose das 12 linhagens clínicas de *C. gattii* da FIOCRUZ do Rio de Janeiro. Os isolados foram co-incubados em um MOI:2 com macrófagos murinos primários por 2h, após opsonização prévia com anticorpo contra cápsula 18B7. Os experimentos foram feitos em triplicata biológica e técnica.

Analisamos a interação dos isolados de *C. gattii* da FIOCRUZ do Rio de Janeiro com macrófagos J774 e observamos valores diferentes da interação com macrófagos murinos primários derivados de medula. Enquanto na interação com os macrófagos primários obtivemos percentual de 55 a 80%, a interação com J774 apresentou variação de 75 a 100%, como podemos observar na figura 13.

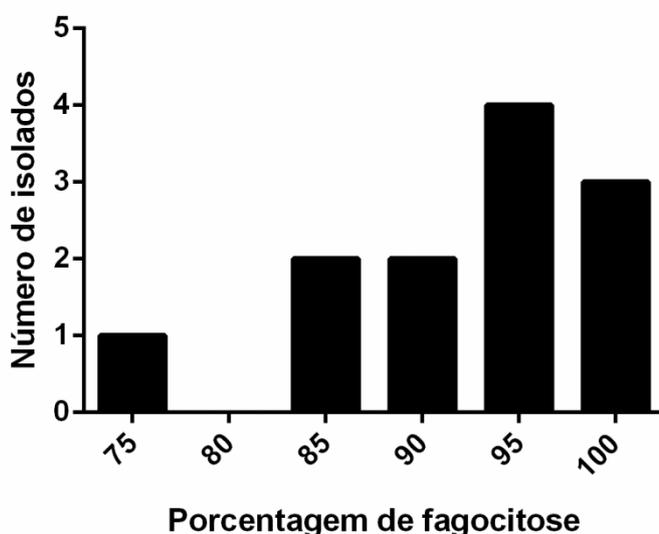


Figura 13. Histograma descritivo do percentual de fagocitose das 12 linhagens clínicas de *C. gattii* da FIOCRUZ do Rio de Janeiro. Os isolados foram co-incubados em um MOI:2 com macrófagos J774 por 2h, após opsonização prévia com anticorpo contra cápsula 18B7. Os experimentos foram feitos em triplicata biológica e técnica.

O percentual de fagocitose dos isolados clínicos de *C. neoformans* do LACEN de Brasília apresentou intervalo de variação de 20 a 55%, conforme podemos observar na figura 14. O isolado CNB003.1 apresentou o menor percentual de fagocitose observado (21%), enquanto o CNB002 apresentou o maior percentual de fagocitose (55%).

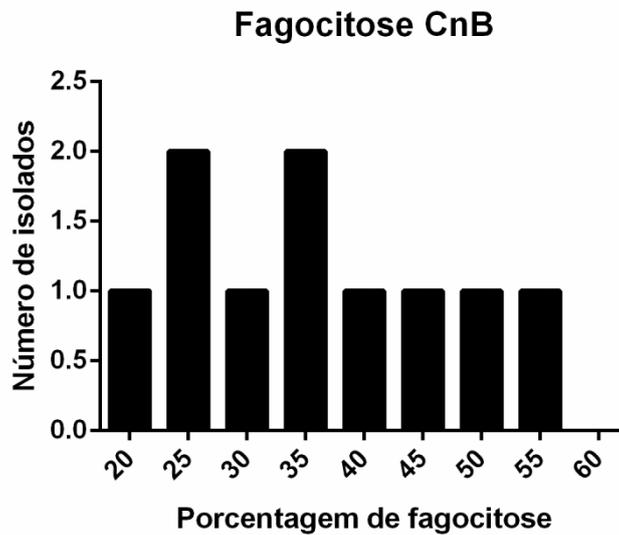


Figura 14. Histograma descritivo do percentual de fagocitose das 10 linhagens *C. neoformans* provenientes do LACEN de Brasília. Os isolados foram co-incubados em um MOI:2 com macrófagos J774 por 2h, após opsonização prévia com anticorpo contra cápsula 18B7. Os experimentos foram feitos em triplicata biológica e técnica.

O índice fagocítico (IF) que se refere ao número médio de células fúngicas internalizadas por macrófagos que haviam internalizado fungo, da interação dos isolados clínicos de *C. neoformans* com os macrófagos apresentou intervalo de variação de 1 a 4,5. A maioria dos isolados apresentaram IF de 3,5 a 4,5 (Figura 15A). Já a interação com os isolados de *C. gattii* demonstrou IF variando de 2,2 a 4 (Figura 15B).

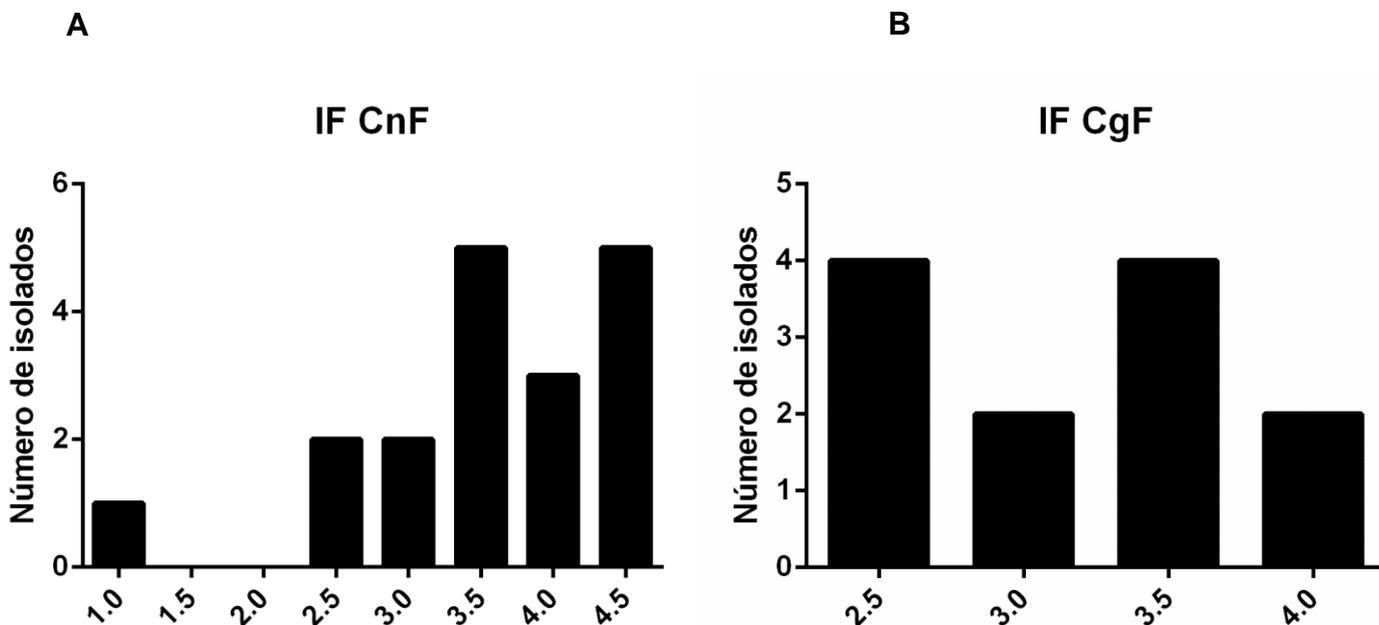


Figura 15. Histograma descritivo do índice fagocítico (IF) dos diferentes isolados clínicos de *Cryptococcus* spp por macrófagos. (A) Dados referentes a fagocitose das 16 linhagens clínicas de *C. neoformans* da FIOCRUZ do Rio de Janeiro e 2 controles de *C. neoformans* (H99 e B3501) (IF CnF) (B) Dados referentes a fagocitose das 12 linhagens clínicas de *C. gattii* da FIOCRUZ do Rio de Janeiro (IF CgF). Os isolados foram co-incubados em um MOI:2 com macrófagos murinos primários por 2h, após opsonização prévia com anticorpo contra cápsula 18B7. Os experimentos foram feitos em triplicata biológica e técnica.

A análise de sobrevivência fúngica realizada após 24h de interação entre os macrófagos murinos derivados de medula de fêmeas de Balb/c, com os isolados clínicos analisados foi realizada coletando-se tanto células fúngicas não internalizadas quanto células fúngicas internalizadas. O número de unidades formadoras de colônia foi normalizado pelo inóculo inicial do fungo, gerando um índice de sobrevivência do fungo. Valores menores que 1, indicam que o número de CFU foi menor do que o inóculo inicial, indicando que os fungos não cresceram ou que foram mortos pelos macrófagos. Valores iguais ou maiores que 1, indicam que o número de fungos na interação permaneceu o mesmo ou que houve crescimento fúngico durante a interação, respectivamente. Podemos observar uma grande variação na viabilidade das diferentes linhagens de *C. neoformans* da FIOCRUZ do Rio de Janeiro após a sua interação com os macrófagos. Foram observados índices de sobrevivência fúngica de 0,2 a 1,6 (Figura 16A). O isolado que demonstrou maior índice de sobrevivência foi o isolado CNF013 com índice de 1,5, em contrapartida o menor índice foi de 0,2 referente aos isolados CNF004, CNF001.2, CNF001.3 e CNF010. As linhagens de 13, 14, 15 e 16 ao final da interação apresentaram

CFU final maior que do que a do inóculo inicial, sugerindo crescimento fúngico, os demais isolados apresentaram valores de CFU menores do que a densidade inicial dos inóculo.

Na figura 16B podemos observar uma variação de índice de sobrevivência de 1 a 4,5 dos isolados de *C. gattii* da FIOCRUZ do Rio de Janeiro. Todos os isolados demonstraram CFU final maior que do que à do inóculo inicial, o que como citado anteriormente sugere crescimento fúngico.

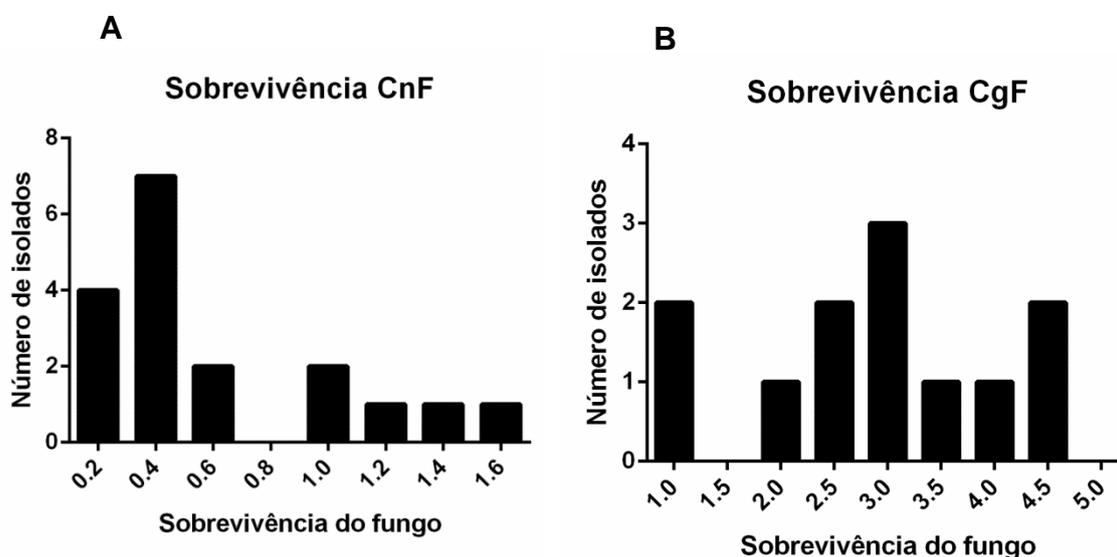


Figura 16. Histograma descritivo do índice de sobrevivência fúngica dos diferentes isolados clínicos de *Cryptococcus* spp por macrófagos. (A) Dados referentes a fagocitose das 16 linhagens clínicas de *C. neoformans* (CnF) da FIOCRUZ do Rio de Janeiro e 2 controles de *C. neoformans* (H99 e B3501) (B) Dados referentes a fagocitose das 12 linhagens clínicas de *C. gattii* (CgF) da FIOCRUZ do Rio de Janeiro. Os isolados foram co-incubados em um MOI:2 com macrófagos murinos primários por 24h, após opsonização prévia com anticorpo contra cápsula 18B7. Os experimentos foram feitos em triplicata biológica e técnica. A razão do índice de sobrevivência é apresentada pelo número total de CFU após 24 horas, dividido por 100 mil (inóculo inicial). Valores maiores do que 1, indicam uma maior capacidade de sobrevivência do isolado após a interação.

A viabilidade das diferentes linhagens de *C. neoformans* do LACEN de Brasília após a sua interação com os macrófagos, apresentou variação com índices sobrevivência de 0,1 a 1,1 (Figura 17). O isolado que demonstrou maior índice de sobrevivência foi o isolado CNB010 com índice de 1,1 em contrapartida o menor índice foi de 0,1 referente ao isolado CNB003.1. Somente uma linhagem (CNB010) ao final da interação apresentou CFU final maior que do que a do inóculo inicial, sugerindo crescimento fúngico, os demais apresentaram índices abaixo do inóculo inicial.

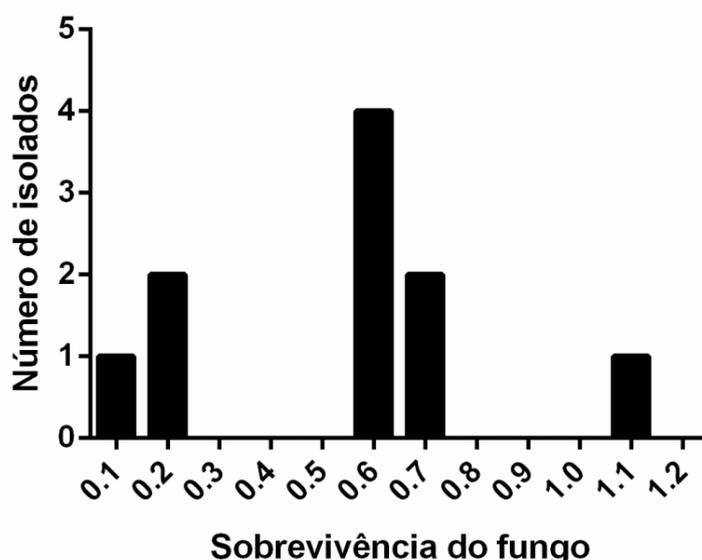


Figura 17. Histograma descritivo do índice de sobrevivência dos 10 isolados de *Cryptococcus neoformans* do LACEN de Brasília. Os isolados foram co-incubados em um MOI:2 com macrófagos J774 por 24h, após opsonização prévia com anticorpo contra cápsula 18B7. Os experimentos foram feitos em triplicata biológica e técnica. A razão do índice de sobrevivência é apresentada pelo número total de CFU após 24 horas, dividido por 100 mil (inóculo inicial). Valores maiores do que 1, indicam uma maior capacidade de sobrevivência do isolado após a interação.

Foi coletado sobrenadantes da interação por 24h dos macrófagos com os diferentes isolados clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii*, para dosagem das citocinas pro-inflamatórias IL-6 e TNF- α , e da quimiocina MCP-1, através da técnica de ELISA citada anteriormente na metodologia.

Foi observada uma variação considerável no padrão de indução da produção dessas citocinas por macrófagos que interagiram com os diferentes isolados clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii*.

Todos os isolados clínicos de *C. neoformans* foram capazes de induzir produção da citocina IL-6, e podemos observar valores de concentração que variaram de 300 a 1100 pg/mL, como pode ser visto na Figura 18A. Os valores de IL-6 da interação dos macrófagos com os isolados de *C. gattii* da FIOCRUZ do Rio de Janeiro revelam produção de indução que varia de 0 a 1200 pg/mL. Dois isolados de *C. gattii* não induziram produção desta citocina (Figura 18B).

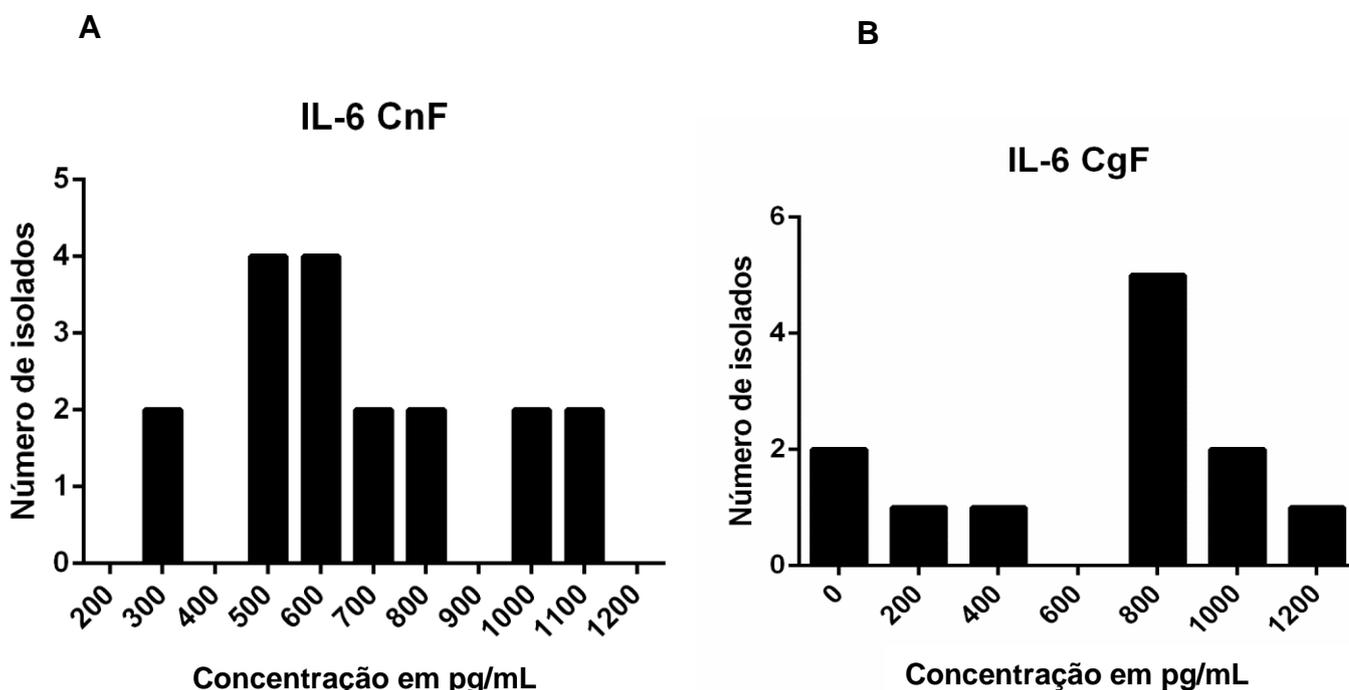


Figura 18. Histograma descritivo da indução de produção de IL-6 dos diferentes isolados clínicos de *Cryptococcus* spp por macrófagos. (A) Dados referentes a fagocitose das 16 linhagens clínicas de *C. neoformans* (CgF) da FIOCRUZ do Rio de Janeiro e 2 controles de *C. neoformans* (H99 e B3501) (B) Dados referentes a fagocitose das 12 linhagens clínicas de *C. gattii* (CgF) da FIOCRUZ do Rio de Janeiro. Os isolados foram co-incubados em um MOI:10 com macrófagos murinos primários por 24h, após opsonização prévia com anticorpo contra cápsula 18B7. Os experimentos foram feitos em triplicata biológica e técnica.

De acordo com a Figura 19A, os valores TNF- α dos isolados de *C. neoformans* apresentaram variação de concentração de 600 a 1500 pg/mL. Assim como na citocina IL-6 e a quimiocina MCP-1 todos os isolados foram capazes de induzir produção de TNF- α . Na figura 19B podemos observar que a maioria dos isolados de *C. gattii* apresentaram valores altos de concentração de TNF- α após interação com macrófagos murinos, com valores acima de 1400 chegando a 2400 pg/mL, sendo que apenas 3 isolados apresentaram valores baixos entre 200 e 400 pg/mL.

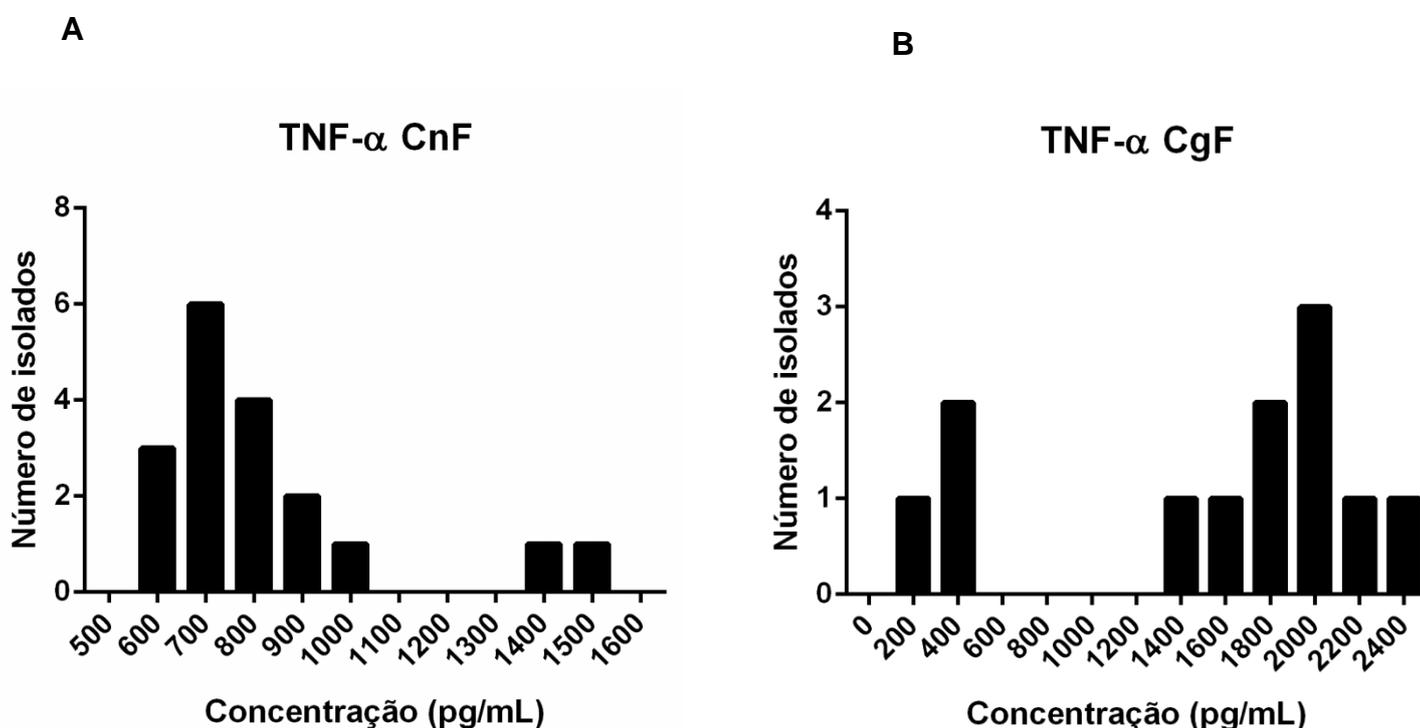


Figura 19. Histograma descritivo da indução de produção TNF- α dos diferentes isolados clínicos de *Cryptococcus* spp por macrófagos. (A) Dados referentes a fagocitose das 16 linhagens clínicas de *C. neoformans* da FIOCRUZ do Rio de Janeiro e 2 controles de *C. neoformans* (H99 e B3501) (B) Dados referentes a fagocitose das 12 linhagens clínicas de *C. gattii* da FIOCRUZ do Rio de Janeiro. Os isolados foram co-incubados em um MOI:10 com macrófagos murinos primários por 24h, após opsonização prévia com anticorpo contra cápsula 18B7. Os experimentos foram feitos em triplicata biológica e técnica.

Os valores de MCP-1 (pg/mL) produzidos após interação revelam índices de produção que variam de 40 a 260 pg/mL, semelhante a citocina

citada acima todos os isolados de *C. neoformans* foram capazes de induzir produção, e a maioria dos isolados demonstrou concentração acima de 220 pg/mL (Figura 20A). Conforme podemos observar na Figura 20B, todos os isolados de *C. gattii* foram capazes de induzir produção da quimiocina MCP-1. Com concentração variando entre 90 e 180 pg/mL.

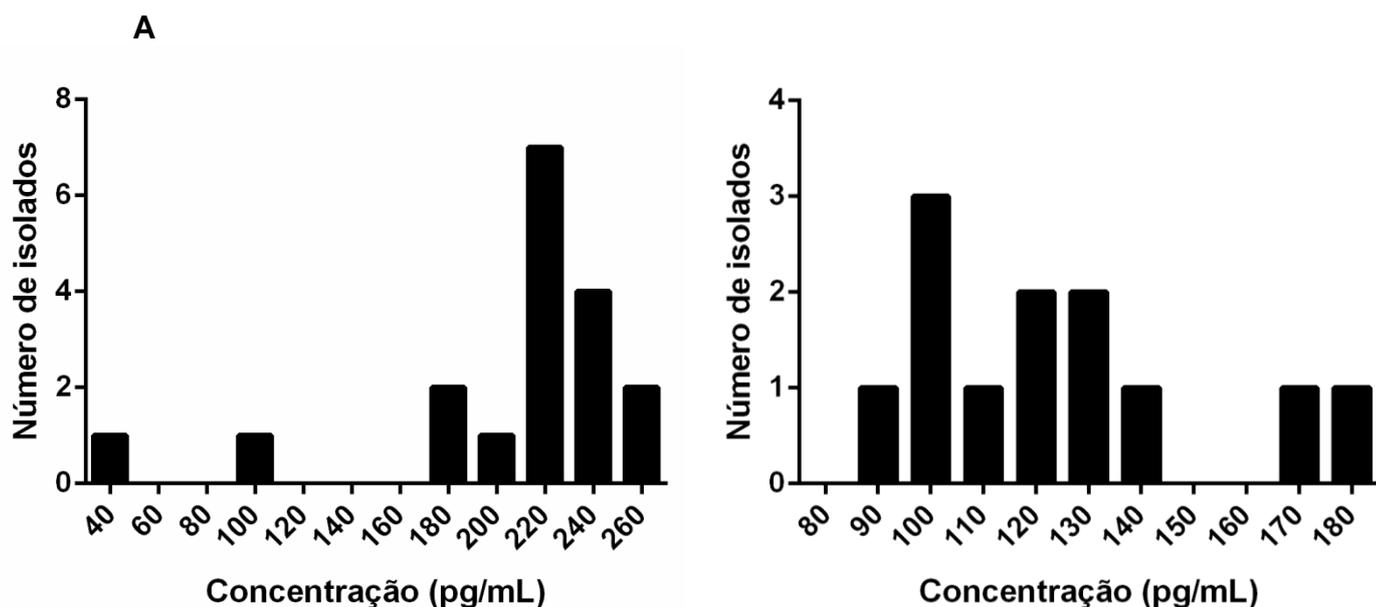


Figura 20. Histograma descritivo da indução de produção MCP-1 dos diferentes isolados clínicos de *Cryptococcus* spp por macrófagos. (A) Dados referentes a fagocitose das 16 linhagens clínicas de *C. neoformans* da FIOCRUZ do Rio de Janeiro e 2 controles de *C. neoformans* (H99 e B3501) (B) Dados referentes a fagocitose das 12 linhagens clínicas de *C. gattii* da FIOCRUZ do Rio de Janeiro. Os isolados foram co-incubados em um MOI:10 com macrófagos murinos primários por 24h, após opsonização prévia com anticorpo contra cápsula 18B7. Os experimentos foram feitos em triplicata biológica e técnica.

6.2. Comparações entre espécies da FIORUZ do Rio de Janeiro

Foi decidido prosseguir as análises tentando identificar possíveis diferenças na interação com macrófagos entre os isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*. Para isso os dados obtidos por isolados foram agrupados por espécie para comparação da habilidade fagocítica dos macrófagos após a interação com os dois grupos de isolados, a sobrevivência do fungo na presença dos macrófagos

e a dosagem de citocinas e quimiocinas inflamatórias de cada isolado na presença dos macrófagos murinos.

Quando analisamos os percentuais de fagocitose após a interação de 2 horas dos macrófagos murinos com as linhagens clínicas de *C. neoformans* e *C. gattii* da FIOCRUZ do Rio de Janeiro, observamos que os isolados de *C. gattii* apresentaram maiores percentuais de fagocitose comparados ao de *C. neoformans*, com significância estatística com valor de $p=0,0146$. Além de uma maior homogeneidade de distribuição conforme podemos observar na Figura 21.

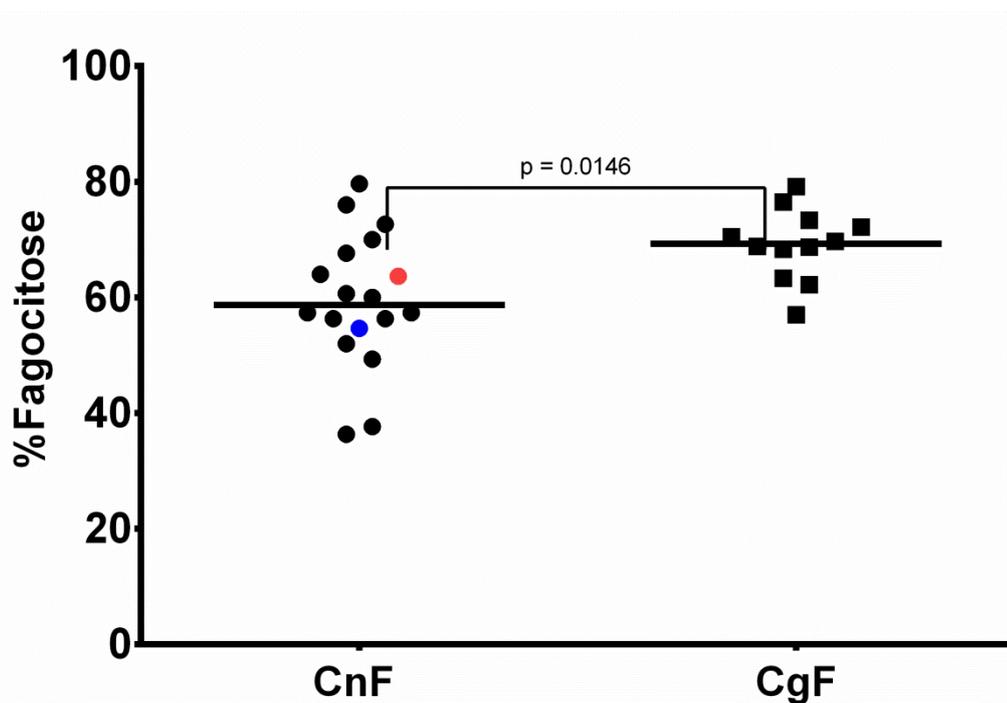


Figura 21. Avaliação da capacidade fagocítica de macrófagos após interação com *C. neoformans* (CnF) e *C. gattii* (CgF), demonstrando maior percentual de fagocitose das linhagens de *C. gattii* (CgF). Os macrófagos foram infectados com isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*, tendo como opsonina o anticorpo anticápsula 18B7, tempo de interação de 2 horas e MOI 1:2. As células foram então coradas com kit panótico. Foi realizada a contagem do número de leveduras internalizadas em 100 macrófagos por poço. Mostrando diferença estatística entre as espécies. Para a avaliação estatística foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Em azul foi marcado a linhagem controle H99 e em vermelho B3501.

Apesar da diferença no percentual de internalização dos isolados de *C. neoformans*, as médias dos índices fagocíticos dos isolados de *C. neoformans*

e de *C. gattii* apresentaram valores semelhantes, apesar dos isolados de *C. neoformans* terem apresentado valores ligeiramente mais elevados, entretanto sem diferença significativa. Os isolados de *C. neoformans* apresentaram valores mais heterogêneos comparados ao de *C. gattii*, conforme podemos observar na Figura 22.

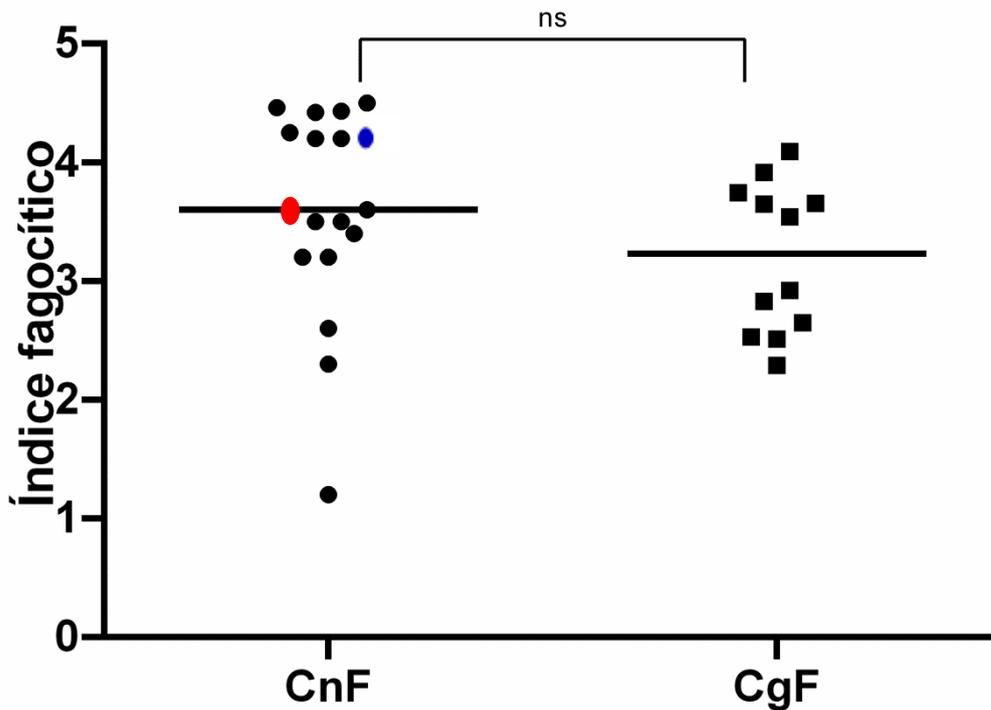


Figura 22. Comparação dos índices fagocíticos da interação de macrófagos murinos com os isolados de *C. neoformans* (CnF) e *C. gattii* (CgF) da FIOCRUZ do Rio de Janeiro após a interação de 2h com macrófagos murinos (MOI 2). Os dados representam análises feitas em triplicatas biológicas feitas em triplicata técnica. Para a avaliação estatística foi utilizado o teste Mann-Whitney. Em azul foi marcado a linhagem controle H99 e em vermelho B3501.

Os isolados de *C. gattii* da FIOCRUZ apresentaram maiores índices de sobrevivência após a interação de 24h com macrófagos murinos, quando comparados com os isolados de *C. neoformans*, como podemos observar na figura 23. Os isolados de *C. gattii* apresentaram índices de sobrevivência cerca de 3 vezes maiores que os de *C. neoformans*. Além disso, a maioria dos

isolados de *C. neoformans* demonstrou um número de unidades formadoras de colônia menor que o inóculo inicial. Em contrapartida todos os isolados de *C. gattii* revelaram quantidade fúngica igual ou superior ao inóculo inicial, demonstrando alta capacidade de sobrevivência e proliferação na interação com macrófagos. Dados apresentaram significância estatística com valor de $p < 0,0001$.

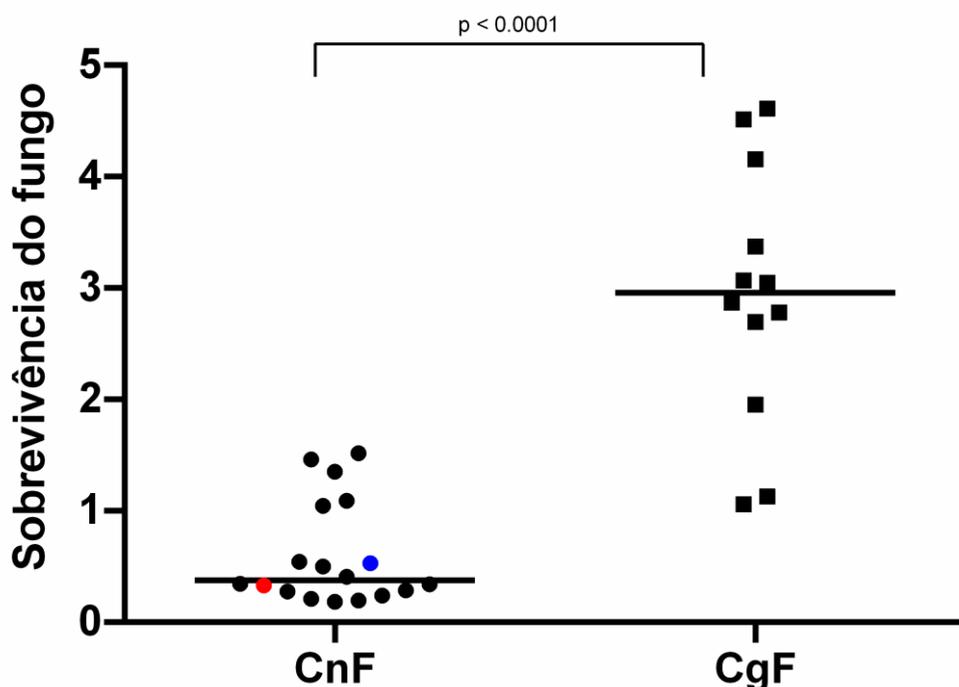


Figura 23. Índice de sobrevivência fúngica de isolados de *C. neoformans* (CnF) e *C. gattii* (CgF) da FIOCRUZ do Rio de Janeiro após a interação de 24h com macrófagos murinos (MOI 2). Os dados representam análises feitas em triplicatas biológicas feitas em triplicata técnica. Para a avaliação estatística foi utilizado o teste Mann-Whitney. Em azul foi marcado a linhagem controle H99 e em vermelho B3501.

Em relação a produção de citocinas pelos macrófagos após a interação com os diferentes isolados, observamos que os isolados de *C. gattii*, induziram os macrófagos a uma maior produção da citocina inflamatória TNF- α quando comparados aos isolados da espécie de *C. neoformans*. Macrófagos que interagiram com os isolados de *C. gattii* produziram em média duas vezes mais TNF- α que aqueles que interagiram com isolados de *C. neoformans*. Enquanto os isolados de *C. neoformans* apresentaram valores máximos de cerca de 1000 pg/mL, os isolados de *C. gattii* tiveram valores máximos de 2300 pg/mL.

Dados apresentaram significância estatística com valor de $p = 0,0245$ (Figura 24).

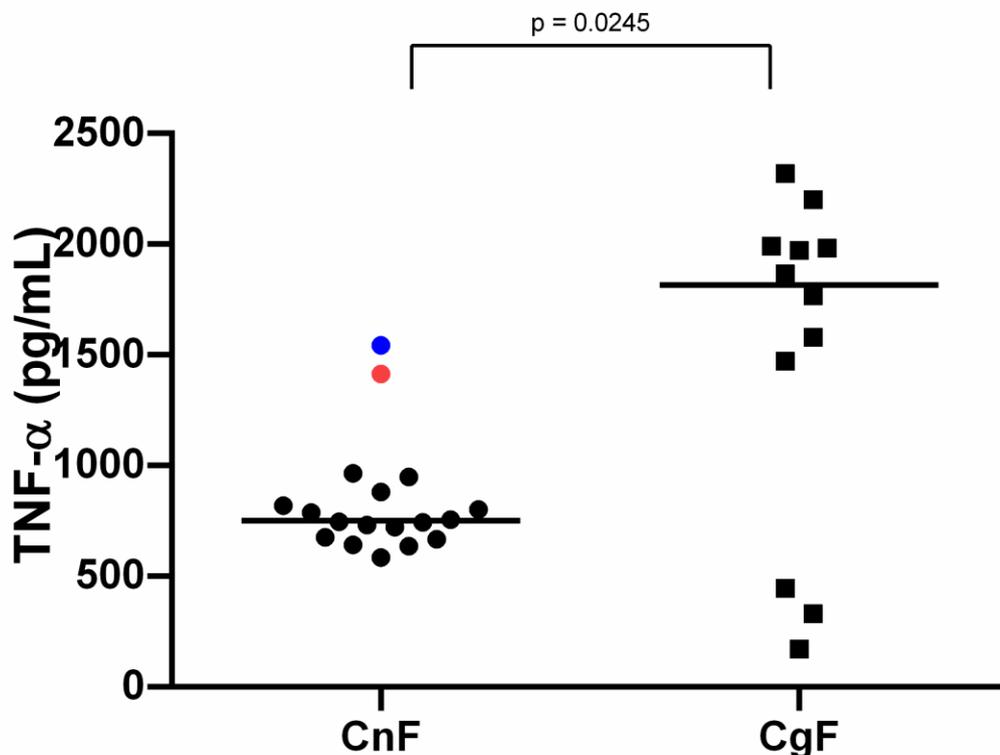


Figura 24. Produção de TNF- α por macrófagos murinos que interagem por 24h com isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* da FIOCRUZ do Rio de Janeiro (MOI 10). Macrófagos foram incubados por 24h isoladamente ou na presença dos diferentes isolados. Após o tempo de incubação, os sobrenadantes do co-cultivo foram coletados para avaliação da produção da citocina por ELISA. Cada ponto representa a média de produção da citocina por macrófagos que interagiram com um determinado isolado. Os dados representam análises feitas em triplicatas biológicas feitas em triplicata técnica. Para a avaliação estatística foi utilizado o teste Mann-Whitney. Em azul foi marcado a linhagem controle H99 e em vermelho B3501.

Apesar da diferença na produção de TNF- α , conforme apresentado na figura 25 podemos observar que não houve diferença significativa na produção de IL-6 entre os isolados de *C. gattii* e *C. neoformans*. O valor médio de concentração dos isolados de *C. neoformans* foi de 650 pg/mL com pico máximo de 1200 pg/mL, já os isolados de *C. gattii* revelaram valor médio de 800 pg/mL e pico máximo de 1250 pg/mL

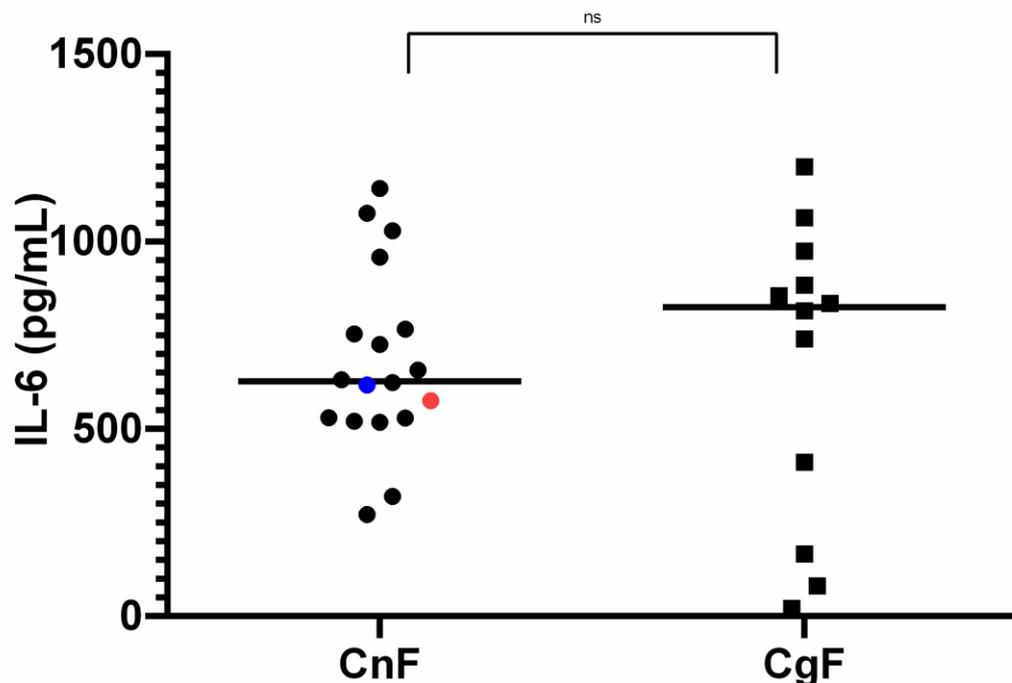


Figura 25. Produção de IL-6 por macrófagos murinos que interagiram por 24h com isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* da FIOCRUZ do Rio de Janeiro (MOI 10). Macrófagos foram incubados por 24h isoladamente ou na presença dos diferentes isolados. Após o tempo de incubação, os sobrenadantes do co-cultivo foram coletados para avaliação da produção da citocina por ELISA. Cada ponto representa a média de produção da citocina por macrófagos que interagiram com um determinado isolado. Os dados representam análises feitas em triplicatas biológicas feitas em triplicata técnica. Para a avaliação estatística foi utilizado o teste Mann-Whitney. Em azul foi marcado a linhagem controle H99 e em vermelho B3501.

Diferente do que foi observado na produção de TNF- α , os isolados de *C. neoformans*, induziram os macrófagos a uma maior produção da quimiocina MCP-1 quando comparados aos isolados da espécie de *C. gattii*. Os isolados de *C. neoformans* apresentaram médias de concentração com o dobro do valor em relação aos *C. gattii*. Dados apresentaram significância estatística com valor de $p=0,0001$ (Figura 26).

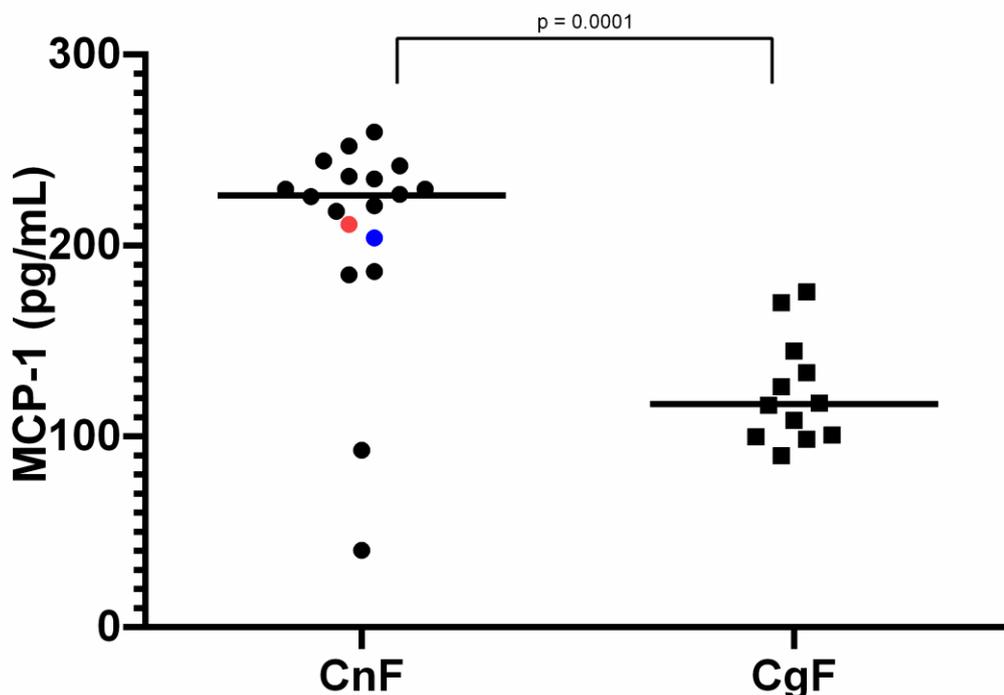


Figura 26. Produção de MCP-1 por macrófagos murinos que interagiram por 24h com isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* da FIOCRUZ do Rio de Janeiro (MOI 10). Macrófagos foram incubados por 24h isoladamente ou na presença dos diferentes isolados. Após o tempo de incubação, os sobrenadantes do co-cultivo foram coletados para avaliação da produção da quimiocina por ELISA. Cada ponto representa a média de produção da citocina por macrófagos que interagiram com um determinado isolado. Os dados representam análises feitas em triplicatas biológicas feitas em triplicata técnica. Para a avaliação estatística foi utilizado o teste Mann-Whitney. Em azul foi marcado a linhagem controle H99 e em vermelho B3501.

6.3. Correlação dos isolados com seus fatores de virulência

Para analisar se a habilidade de macrófagos murinos fagocitarem as diferentes linhagens de *C. neoformans* da FIOCRUZ- RJ estaria relacionada com a sobrevivência do fungo, foi feita uma correlação linear de Pearson, a qual demonstrou em primeira análise na Figura 27, uma correlação positiva e significativa com valor de $r=0,5403$, e $p=0,0206$ (A). No qual quanto maior a internalização do fungo maior é a sua sobrevivência após a interação. No entanto, quando combinamos os resultados obtidos com os isolados do Rio de

Janeiro com os dos isolados de Brasília, essa correlação não parece ser significativa, $r=0,3325$, e $p=0,0838$ (B).

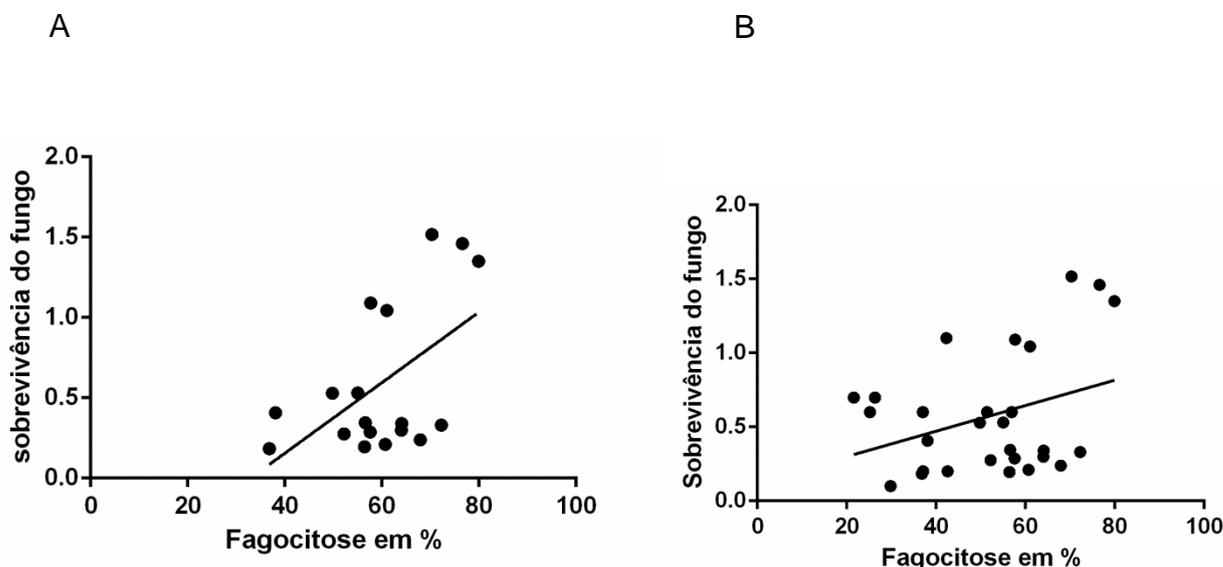


Figura 27. Análise de correlação do percentual de fagocitose com o índice de sobrevivência fúngica dos diferentes isolados de *C. neoformans* após a interação com macrófagos (A) Correlação positiva entre habilidade de fagocitose e sobrevivência das linhagens clínicas de *C. neoformans* da FIOCRUZ de Rio de Janeiro. $r = 0,5403$; $p = 0,0206$. (B) Ausência de correlação entre a fagocitose com a sobrevida do fungo dos isolados de *C. neoformans* da FIOCRUZ-RJ e LACEN de Brasília, $r=0,3325$, e $p=0,0838$.

Observamos uma correlação semelhante entre o percentual de internalização do isolados de *C. gattii* da FIOCRUZ de Rio de Janeiro com a sua habilidade de sobreviver, também indicando que a habilidade do fungo ser internalizado pode estar relacionada a sua habilidade de sobreviver a interação (Figura 28).

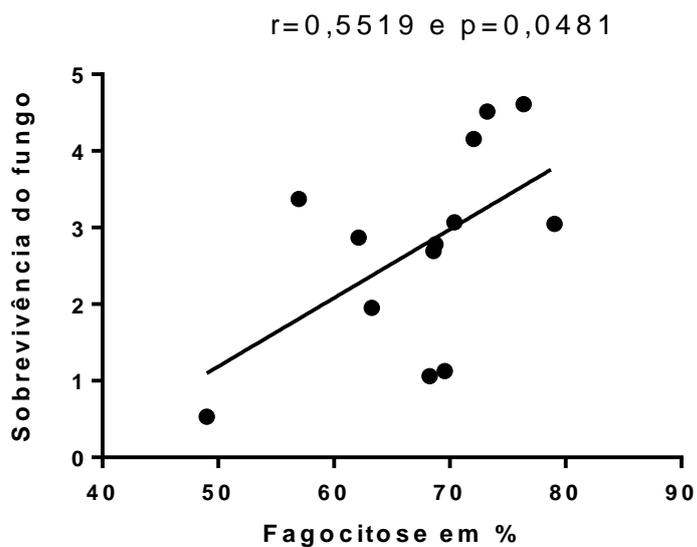


Figura 28. Correlação entre a taxa de internalização do isolados por macrófagos e a taxa de sobrevivência das linhagens clínicas de *C. gattii* da FIOCRUZ de Rio de Janeiro após a interação com macrófagos. $r= 0,5519$; $p= 0,0481$

Quando foi analisado separadamente os dados da interação dos macrófagos J774 com a capacidade de sobrevivência fúngica dos isolados do LACEN de Brasília, não observamos nenhuma correlação entre os fenótipos, $r=0,001942$ e $p= 0,9038$, conforme podemos observar na figura 29.

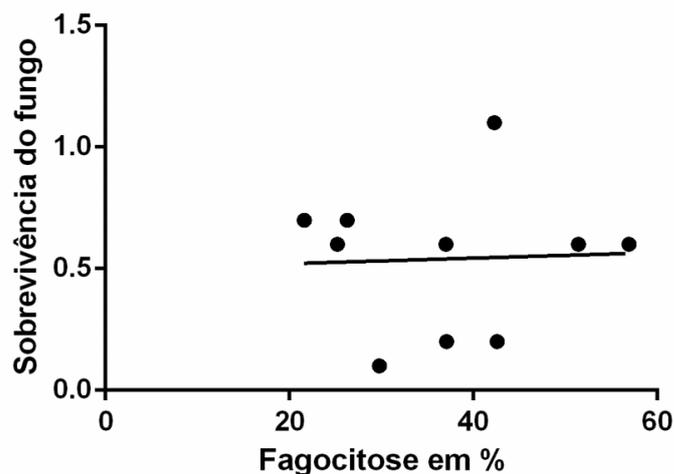


Figura 29. Correlação entre a taxa de internalização dos isolados por macrófagos e a taxa de sobrevivência das linhagens clínicas de *C. neoformans* do LACEN de Brasília após a interação com macrófagos. $r=0,001942$ e $p=0,9038$.

Para testar a hipótese de que os isolados poderiam estar modulando o fenótipo de indução de produção de citocinas na interação de macrófagos como forma de sobrevivência, foi analisada a possível correlação entre as citocinas testadas e a sobrevivência do fungo.

Foi observado uma correlação negativa entre a produção de IL-6 (figura 30) e MCP-1 (figura 32) por macrófagos que interagiram com isolados de *C. neoformans* da FIOCRUZ do Rio de Janeiro e o índice de sobrevivência fúngica dos isolados. No entanto, não observamos nenhuma correlação entre a produção de TNF- α e a sobrevivência dos isolados, conforme podemos ver na figura 31.

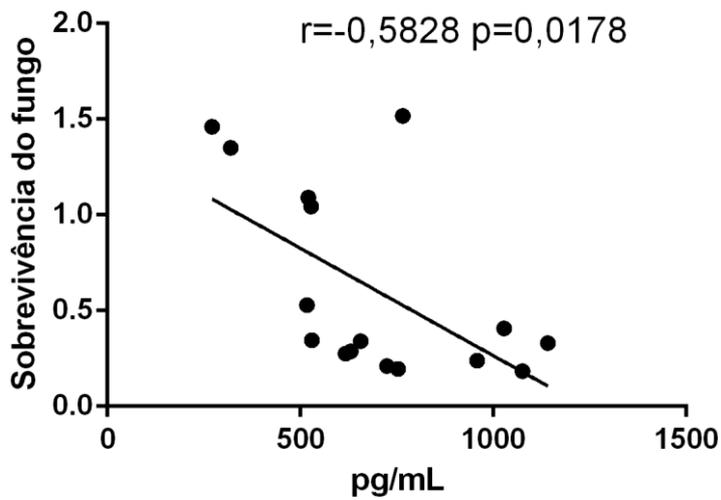


Figura 30. Correlação negativa entre a produção de IL-6 por macrófagos e a taxa de sobrevivência das linhagens clínicas de *C. neoformans* da FIOCRUZ de Rio de Janeiro após a interação com macrófagos. $r = -0,5828$; $p = 0,0178$

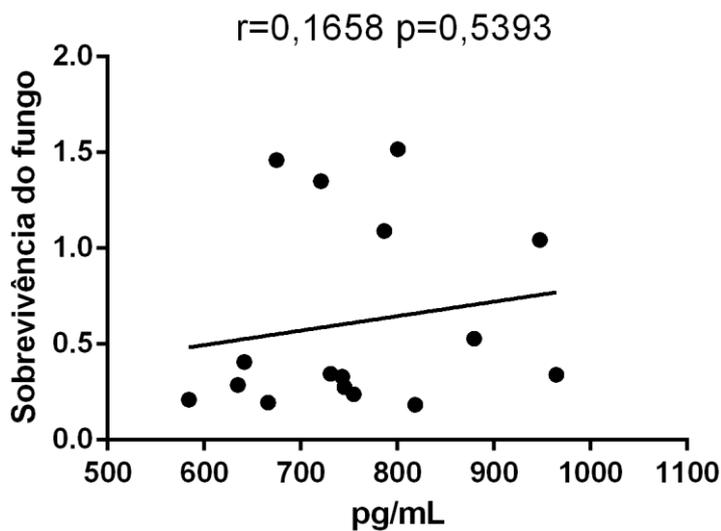


Figura 31. Ausência de correlação entre a produção de TNF- α por macrófagos e a taxa de sobrevivência das linhagens clínicas de *C. neoformans* da FIOCRUZ de Rio de Janeiro após a interação com macrófagos. $r = -0,1658$; $p = 0,5393$.

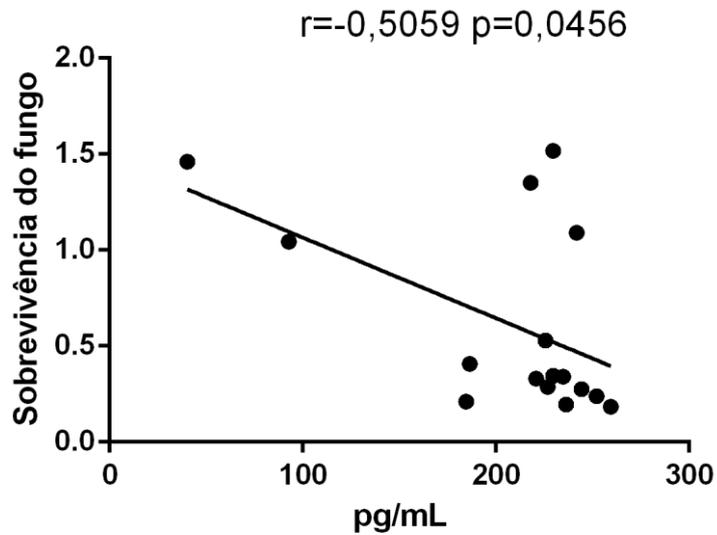


Figura 32. Correlação negativa entre a produção de MCP-1 por macrófagos e a taxa de sobrevivência das linhagens clínicas de *C. neoformans* da FIOCRUZ de Rio de Janeiro após a interação com macrófagos. $r = -0,5059$; $p = 0,0456$.

Em relação aos isolados de *C. gattii* da FIOCRUZ do Rio de Janeiro não observamos nenhuma correlação entre a sobrevivência do fungo e a produção de nenhuma das três citocinas por macrófagos que interagiram com os diferentes isolados (Figura 33, 34 e 35), indicando que a produção dessas citocinas por macrófagos possa não ter um papel tão importante na sobrevivência fúngica, como observado com os isolados de *C. neoformans*.

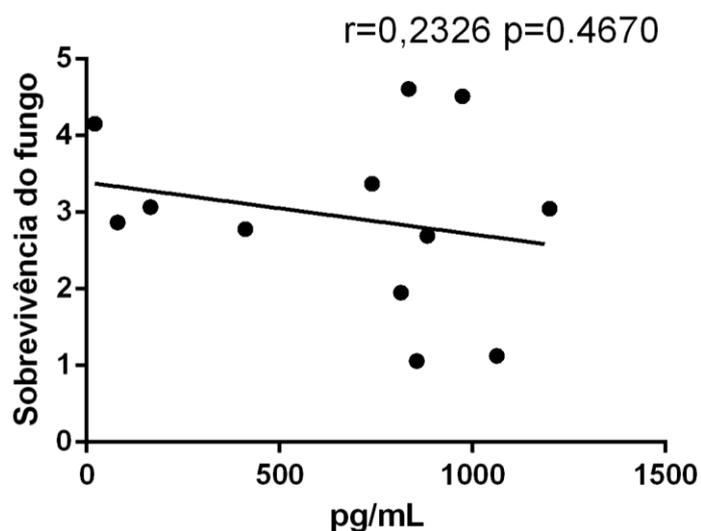


Figura 33. Ausência de correlação entre a produção de IL-6 por macrófagos e a taxa de sobrevivência das linhagens clínicas de *C. gattii* da FIOCRUZ de Rio de Janeiro após a interação com macrófagos. $r= 0,2326$; $p= 0,4670$.

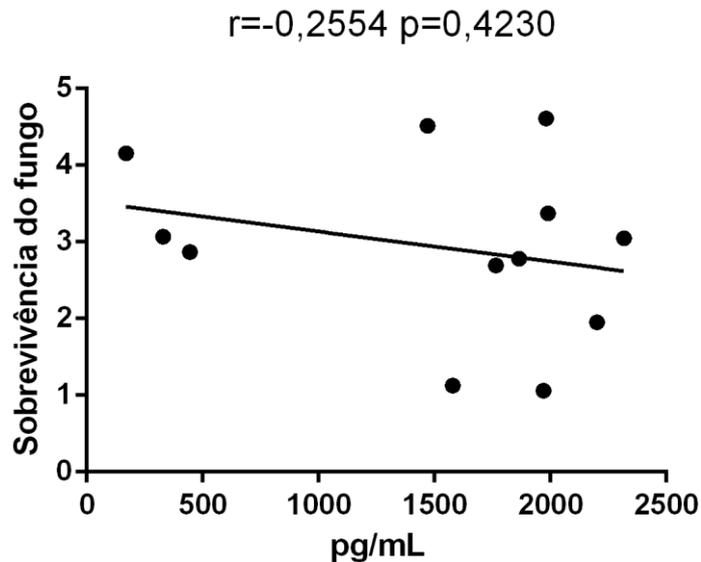


Figura 34. Ausência de correlação entre a produção de TNF- α por macrófagos e a taxa de sobrevivência das linhagens clínicas de *C. gattii* da FIOCRUZ de Rio de Janeiro após a interação com macrófagos. $r= -0,2554$; $p= 0,4230$.

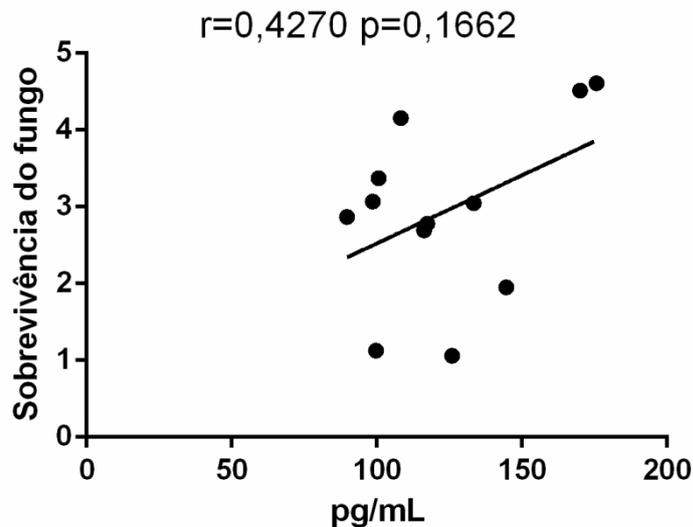


Figura 35. Ausência correlação entre a produção de MCP-1 por macrófagos e a taxa de sobrevivência das linhagens clínicas de *C. gattii* da FIOCRUZ de Rio de Janeiro após a interação com macrófagos. $r= -0,4270$; $p= 0,1662$.

7. Discussão

A criptococose é uma doença cosmopolita grave, com maior impacto em países em desenvolvimento pela dificuldade ao acesso ao diagnóstico e medicação (WHO, 2018). Por esse motivo, estudos que possam esclarecer a interação patógeno hospedeiro são essenciais. Como já foi citado estudos que caracterizam as diferenças entre as espécies causadoras da criptococose não forma claramente elucidados. No Brasil, cerca de 90% dos casos de criptococose apresentam a forma mais grave da doença a meningoencefalite, enquanto alguns casos apresentem sintomas restritos ao pulmão ou se disseminam para outros órgãos (SANTOS *et al*, 2008). Casos da doença com maior frequência relacionada à espécie *C. gattii*, foram observados em estudos realizados em Belém do Pará, no qual a maioria absoluta de casos apresentava lesão do SNC (SANTOS *et al*, 2008).

Devido à escassez de dados referentes a interação patógeno-hospedeiro de *Cryptococcus* spp aqui no Brasil e apesar das características clínicas das doenças causadas pelas duas espécies ser amplamente

estudadas, ainda não são claros todos os fatores que determinam essas diferenças. Como macrófagos são importantes células na imunidade contra *Cryptococcus* spp foi avaliado diferenças na interação de diferentes isolados clínicos com macrófagos a fim de identificar possíveis diferenças que possam explicar as diferenças clínicas nas doenças causadas pelos dois fungos.

Os dados revelaram uma maior taxa de internalização dos isolados de *C. gattii*, quando comparada aos de *C. neoformans*. Já dados de um estudo com isolados da Tailândia apresentou resultados opostos (HANSAKON *et al.*, 2019). É importante salientar que embora nas duas circunstâncias a interação para análise de fagocitose tenha acontecido por duas horas com fungos previamente opsonizados por 18B7, os experimentos do outro grupo utilizaram a linhagem imortalizada J774 após ativação com Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) utilizando um MOI de 10, enquanto usamos macrófagos primários não ativados e um MOI de 2. Essas diferenças nas resultantes da interação quando comparamos as duas linhagens de macrófago, poderiam também explicar algumas das diferenças que observamos na interação dos isolados clínicos de *C. neoformans* do LACEN que foram submetidos à interação com J774 em comparação com os resultados observados com os isolados de *C. neoformans* da FIOCRUZ/RJ que interagiram com macrófagos primários.

Considerando-se apenas o tamanho da cápsula, isolados de *C. gattii* de maneira geral, apresentem tamanho capsular maior quando comparado a isolados de *C. neoformans* confirmaram essa diferença. No entanto, apesar da cápsula ser um importante fator antifagocítico e do tamanho dessa estrutura poder afetar a internalização do fungo, outros fatores como sua composição e estrutura, a presença de soro e o tipo de fagócitos também podem ser importantes na fagocitose do fungo e na sua eliminação ou sobrevivência (DEL POETA, 2004). Além disso, foi demonstrado anteriormente que um maior tamanho da cápsula pode favorecer a internalização de *Cryptococcus* quando anticorpos são usados como opsoninas (ZARAGOZA; CASADEVALL, 2003). Além da maior fagocitose, os isolados de *C. gattii* também apresentaram maiores taxas de sobrevivência/proliferação após a interação com macrófagos. Embora possa parecer contraditória uma maior internalização do fungo com

uma maior taxa de sobrevivência é importante lembrarmos que *Cryptococcus* é um parasita intracelular facultativo de macrófagos (Feldmesser, Toker e Casadevall, 2001). Além disso, foi demonstrando uma correlação positiva entre a taxa de internalização de isolados clínicos por macrófagos *in vitro* com a carga fúngica de isolados de *C. neoformans* no líquido céfalo-raquidiano (SABIITI *et al.*, 2014).

As análises dos dados mostram que os isolados de *C. gattii* sobreviveram mais quando comparados aos isolados de *C. neoformans*. O que poderia sugerir um fenótipo mais virulento destes espécimes, já que esta espécie infecta e causa doença em indivíduos normalmente imunocompetentes. Nesse sentido, nossos dados se assemelham a literatura que demonstra em estudos realizados por Hansakon e colaboradores em 2018 que isolados clínicos de *C. gattii* da Tailândia tem capacidade de sobreviver e proliferar mais do que isolados de *C. neoformans* da região.

Alguns dados mostram que *C. gattii* após ser fagocitado tem capacidade de regular negativamente a maturação de células dendríticas e a expressão de moléculas coestimulatórias MHC II, CD80, CD86 e assim reduzir a apresentação de antígenos para células T favorecendo sua sobrevivência e replicação (HUSTON *et al.*, 2013).

Relaciona-se o *C. gattii* a maior virulência, comparado ao *C. neoformans*, já que indivíduos supostamente saudáveis são infectados e desenvolvem a doença por esta espécie (OLIVEIRA *et al.*, 2008; PAULA *et al.*, 2015; AMARAL *et al.*, 2016). Os dados deste trabalho sugerem que a maior taxa de internalização dos isolados de *C. gattii* pode se relacionar com uma maior habilidade desses isolados em sobreviver e se proliferar após a interação com macrófagos, quando comparados com os isolados de *C. neoformans*.

Leveduras da espécie *C. gattii* apresentam maior resistência ao tratamento do fluconazol comparadas a *C. neoformans*. Em um estudo sobre a susceptibilidade *in vitro* de 57 isolados de *C. gattii* e 30 de *C. neoformans* a agentes antifúngicos, foi observado que isolados de *C. gattii* demonstraram menor susceptibilidade a quase todos os antifúngicos testados quando comparados aos isolados de *C. neoformans*, esse resultado só não era observado em relação a anfotericina B e flucitosina, para as quais não houve

diferença significativa na suscetibilidade entre as espécies (TRILLES *et al.*, 2004). A criptococose causada por *C. gattii* apresenta algumas particularidades quando comparada ao *C. neoformans*. Entre essas, a presença de hidrocefalia, maior ocorrência de criptococomas cerebrais e pulmonares, sequelas neurológicas e necessidade de terapia antifúngica prolongada são características da criptococose causada por essa espécie (LEAL, 2006; SEVERO; GAZZONI; SEVERO, 2009).

Além disso, observamos uma correlação entre a habilidade fagocítica dos macrófagos na interação com os isolados clínicos com a capacidade de sobrevivência das linhagens em contato com os fagócitos, corroborando com nossas observações prévias. Observamos que quanto mais o fungo era fagocitado, mas ele apresentava capacidade de sobreviver e se proliferar dentro dos macrófagos e estes achados foram observados tanto nos isolados de *C. neoformans* quanto nos isolados de *C. gattii* da FIOCRUZ do Rio de Janeiro. Todavia, não observamos uma correlação entre a habilidade de fagocitose dos macrófagos e a sobrevivência fúngica nas análises feitas com os isolados de *C. neoformans* do LACEN de Brasília já testados neste trabalho. Embora não possamos eliminar possíveis diferenças fenotípicas relacionadas a origem geográfica dos diferentes isolados, é importante lembrarmos que as análises com os isolados do LACEN foram feitas com macrófagos de linhagem diferente dos testes com isolados da FIOCRUZ. Considerando as diferenças previamente discutidas entre os nossos resultados e os resultados do grupo da Tailândia (HANSAKON *et al.* 2019), diferenças das células hospedeiras podem ter um papel importante nas diferenças observadas entre os dois grupos de isolados. Estudos com demais isolados do LACEN e com a linhagem de macrófagos primários derivados de medula devem ser realizados para avaliar essa hipótese.

Os isolados de *C. neoformans* da FIOCRUZ-RJ apresentam classificação molecular VNI e os isolados de *C. gattii* FIOCRUZ-RJ VGII. Em um estudo de investigação de distribuição molecular e geográfica mundial realizado por Cogliati (2013) com isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* e *C. gattii*, foi observado que no Brasil os genótipos relatados eram VGII, VGI, VGIII nos isolados de *C. gattii*. Já em um estudo realizado na região

norte, no período de 2003 a 2007 com 56 isolados de *Cryptococcus* spp, os isolados de *C. neoformans* (28) apresentaram classificação molecular VNI e os de *C. gattii* (28), apresentaram classificação molecular VGII em 23 dos 25 isolados e apenas 3 isolados eram VGI, o que corrobora com a distribuição molecular dos isolados da FIOCRUZ-RJ estudados neste trabalho (SANTOS et al., 2008).

A resposta imune contra a criptococose é caracterizada por uma elevação na produção de citocinas pró-inflamatórias associadas a ativação e polarização de linfócitos T auxiliares 1 ou Th1 (T helper 1) que desempenha função efetora ao produzir citocinas que recrutam e ativam células importantes, tais como macrófago, DC entre outras células para eliminação do fungo (UPADHYA *et al.*, 2016). Portanto o padrão de citocinas produzidas e predominantes da interação com o fungo é essencial para eliminação e/ou proliferação e disseminação fúngica.

Neste estudo foi analisado a indução de produção das citocinas TNF- α , IL-6 e MCP-1, ambas citocinas produzidas por macrófagos e importantes no curso da criptococose. Quanto à diferença em relação à produção das citocinas inflamatórias observamos que apesar de ambas as espécies terem sido capazes de induzir produção das citocinas IL-6, TNF- α e MCP-1, os isolados de *C. gattii* foram capazes de induzir uma maior produção de TNF- α pelos macrófagos que *C. neoformans*, embora ambas espécies tenham induzido a produção de níveis semelhantes de IL-6. Outra diferença entre os isolados foi que isolados de *C. neoformans* foram capazes de induzir maior produção de MCP-1.

Em estudos realizados por Schoffelen e colaboradores em 2013, demonstram que espécies do complexo de *C. gattii* mortos pelo calor induziram maiores concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-17/22 do que aquelas observadas no complexo de espécies de *C. neoformans* (SCHOFFELEN *et al.*, 2013). *Tais resultados corroboram os nossos achados.*

Níveis elevados das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8, IFN- γ e TNF- α no soro têm sido associados à sobrevida da meningite criptocócica em pacientes com HIV (MORA *et al.*, 2017).

Em estudo realizado na França, em que era observada a influência do sexo na infecção disseminada de *C. neoformans* em modelo experimental de camundongos, foi observado que fêmeas infectadas com o fungo foram capazes de produzir maiores concentrações no sangue e baço de TNF- α e IFN- γ quando comparadas a machos. Esse aumento pode estar associado a com a produção de hormônios estradiol e progesterona, e fatores como sexo e idade são importantes e devem ser considerados quando se estuda interação-patógeno hospedeiro na criptococose (LORTHOLARY *et al.*, 2002).

Os níveis mais altos de TNF- α nos isolados de *C. gattii* podem ser derivados da maior taxa de internalização desse fungo quando comparado com os isolados de *C. neoformans*.

MCP-1 é uma proteína quimioatrativa de monócitos produzida por uma variedade células inclusive macrófagos. Ela é importante em modelos experimentais de criptococose para formação de granulomas (ELSEGEINY *et al.*, 2018). MCP-1 é produzida durante a indução de criptococose experimental, e a neutralização desta quimiocina resulta na diminuição do recrutamento de células e aumento da carga fúngica (HUFFNAGLE *et al.*, 1995), o que corrobora com nossos achados já que os isolados de *C. gattii* induziram menor produção deste quimiocina e conseguiram sobreviver e se proliferar mais na interação com os macrófagos murinos estudados.

Foi observado que leveduras da linhagem *C. neoformans* são capazes de induzir produção de MCP-1 de forma dose dependente, ao interagir com mastócitos humanos (LOPES *et al.*, 2019). Estudos anteriores mostram que a infecção por *C. neoformans* estimula a produção de MCP-1 nos pulmões (HUFFNAGLE *et al.*, 1995) e a falha na indução de MCP-1 resultou em uma diminuição na resposta inflamatória mediada por células e na depuração criptocócica *in vivo* (HUFFNAGLE *et al.*, 1995; LEVITZ *et al.*, 1999).

Outro resultado observado foi uma correlação negativa entre indução de produção de IL-6 por macrófagos com a taxa de sobrevivência dos isolados de *C. neoformans*, indicando que quanto maior a produção da citocina, menor a taxa de sobrevivência fúngica. Uma hipótese para isso é que fungos com maior habilidade de sobreviver a interação poderiam de alguma forma estar regulando negativamente a indução de produção desta citocina como medida

de sobrevivência. No entanto não observamos a mesma correlação entre a produção de IL-6 por macrófagos com a sobrevivência fúngica nas análises com os isolados de *C. gattii*, sugerindo que possam existir diferenças nas estratégias de modulação do sistema imune entre as duas espécies.

A hipótese para esse achado, é que o fungo poderia estar sobrevivendo e se proliferando na interação com macrófago através de mecanismo de exocitose não lítica. O escape do fungo através de exocitose não lítica e a disseminação de célula já foram descritos em culturas *in vitro* de macrófagos murinos e humanos (MA *et al.*, 2006).

É esperado que os demais resultados de análises das interações dos isolados do LACEN estejam correlacionadas a características clínicas dos pacientes, o que explicaria a diferença na virulência de cada espécime e porque algumas linhagens são capazes de causar manifestações mais graves, enquanto outras são facilmente eliminadas, apesar do macrófago ser a célula mais eficiente na eliminação deste fungo, não podemos excluir a importância de características do hospedeiro como diferenças na imunidade inata e também da adaptativa, além de fatores genéticos.

8. Limitações

A correlação dos fenótipos observados com os dados clínicos dos pacientes é fator primordial para o desenvolvimento deste trabalho, entretanto não temos dados clínicos dos isolados da FIOCRUZ do Rio de Janeiro caracterizando uma das principais limitações do nosso trabalho, somente dados dos pacientes dos isolados do LACEN de Brasília. Outra limitação do trabalho foi não ter conseguido analisar um número maior de amostras do LACEN de Brasília, e a utilização de uma linhagem diferente de macrófagos da que foi usada nas interações com os isolados do Rio de Janeiro o que dificultou a identificação de possíveis diferenças geográficas entre os isolados.

9. Conclusão

Nesse estudo de diferenças entre isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*, mostramos que os isolados de *C. gattii* da FIOCRUZ- RJ foram mais fagocitados e apresentam maior sobrevivência fúngica ao mesmo tempo que induziram uma maior produção de TNF-alfa nos macrófagos em relação aos isolados de *C. neoformans*. Em contrapartida, os isolados de *C. neoformans* foram capazes de induzir maior produção de MCP-1 por macrófagos em relação aos isolados de *C. gattii*. Observamos também uma correlação positiva entre a sobrevivência fúngica e a taxa de fagocitose dos isolados de *C. neoformans* da FIOCRUZ do Rio de Janeiro, indicando que quanto maior for a internalização do fungo, maior a sua taxa de sobrevivência. Quanto à correlação de produção de citocinas e a sobrevivência fúngica, observamos que os isolados clínicos de *C. neoformans* da FIOCRUZ do Rio de Janeiro apresentaram correlação negativa com a citocina IL-6, e a quimiocina MCP-1.

Em conclusão, isolados de *C. gattii* foram fagocitados com mais eficiência, o que já havia sido associado a uma melhor sobrevivência dos fungos no sistema nervoso central. Eles também foram mais capazes de resistir à atividade antifúngica do macrófago e levaram à diminuição da secreção de MCP-1. Esses resultados podem apontar razões para a maior incidência da doença por *C. gattii* em pessoas imunocompetentes. Nossa perspectiva é que a análise de um maior número de isolados do LACEN de Brasília confirme as observações até agora feitas nesse trabalho e que esses fenótipos sejam semelhantes em relação às linhagens desta espécie. As diferenças entre os resultados obtidos com macrófagos primários e células imortalizadas sugerem que seria interessante testar a interação dos isolados de Brasília também com células primárias, ou testarmos a interação dos isolados da FIOCRUZ com macrófagos J774.

De modo geral, espera-se que nossos resultados contribuam na elucidação da interação deste fungo com os macrófagos, a principal célula efetora na infecção desse fungo, além de elucidar as diferenças entre espécies causadoras da doença aqui no Brasil. E assim, de alguma maneira facilitar no

desenvolvimento de soluções que favorecem o diagnóstico, tratamento e a prevenção dessa doença.

Referências Bibliográficas

ALSPAUGH, J. Andrew et al. RAS1 regulates filamentation, mating and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, v. 36, n. 2, p. 352-365, 2000.

ALVAREZ, Mauricio; CASADEVALL, Arturo. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. **Current Biology**, v. 16, n. 21, p. 2161-2165, 2006.

ALVES SOARES, Emmanuel et al. Mortality by cryptococcosis in Brazil from 2000 to 2012: A descriptive epidemiological study. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 7, p. e0007569, 2019.

AMARAL, Danielle Mechereffe do et al. Disseminated cryptococcosis manifested as a single tumor in an immunocompetent patient, similar to the cutaneous primary forms. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 91, n. 5, p. 29-31, 2016.

ANDERSON, G. G.; O'TOOLE, G. A. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. **Bacterial biofilms**, p. 85-105, 2008.

ARAÚJO JÚNIOR, Erivelto Corrêa de et al. *Cryptococcus*: isolamento ambiental e caracterização bioquímica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 4, p. 1003-1008, 2015.

ARORA, Shikha et al. Effect of cytokine interplay on macrophage polarization during chronic pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 79, n. 5, p. 1915-1926, 2011

ARORA, Shikha et al. Role of IFN- γ in regulating T2 immunity and the development of alternatively activated macrophages during allergic bronchopulmonary mycosis. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 10, p. 6346-6356, 2005.

BANERJEE, P. et al. Cryptococcus laurentii fungemia. **Indian journal of medical microbiology**, v. 31, n. 1, p. 75, 2013.

BARCHIESI, F. et al. Comparative analysis of pathogenicity of Cryptococcus neoformans serotypes A, D and AD in murine cryptococcosis. **Journal of Infection**, v. 51, n. 1, p. 10-16, 2005.

BERNAL-MARTINEZ, Leticia et al. Susceptibility profile of clinical isolates of non-Cryptococcus neoformans/non-Cryptococcus gattii Cryptococcus species and literature review. **Medical mycology**, v. 48, n. 1, p. 90-96, 2010.

BIDLA, Gawa et al. Activation of insect phenoloxidase after injury: endogenous versus foreign elicitors. **Journal of Innate Immunity**, v. 1, n. 4, p. 301-308, 2009.

BOVERS, Marjan; HAGEN, Ferry; BOEKHOUT, Teun. Diversity of the Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii species complex. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, n. 1, p. S4, 2008

BRASIL. Vigilância e epidemiologia da criptococose, BRASÍLIA, 2012.

BROWN, Gordon D. et al. Hidden killers: human fungal infections. **Science translational medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13-165rv13, 2012.

BUCHANAN, Kent L.; MURPHY, Juneann W. What makes Cryptococcus neoformans a pathogen?. **Emerging infectious diseases**, v. 4, n. 1, p. 71, 1998.

BUTLER, Michael J. et al. Pathogenic properties of fungal melanins. **Mycologia**, v. 93, n. 1, p. 1-8, 2001.

BYRNES, E. J.; BILDFELL, R. J.; FRANK, S. A.; MITCHELL, T. G.; MARR, K.A.; et al. Molecular evidence that the range of the Vancouver Island outbreak of Cryptococcus gattii infection has expanded into the Pacific Northwest in the United States. **J Infect Dis**, v.199: p. 1081–1086, 2009.

CASADEVALL, Arturo; COELHO, Carolina; ALANIO, Alexandre. Mechanisms of Cryptococcus neoformans-mediated host damage. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 855, 2018.

CASADEVALL, Arturo; ROSAS, Angel L.; NOSANCHUK, Joshua D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Current opinion in microbiology**, v. 3, n. 4, p. 354-358, 2000.

CDC. Cryptococcal meningitis: a deadly fungal disease among people living with HIV/AIDS. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. Retirado de: <http://www.cdc.gov/fungal/pdf/at-a-glance-508c.pdf>

CHANG, Yun C.; KWON-CHUNG, K. J. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. **Molecular and cellular biology**, v. 14, n. 7, p. 4912-4919, 1994.

CHANG, Yun C.; PENOYER, Lisa A.; KWON-CHUNG, K. J. The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans*, CAP64, is essential for virulence. **Infection and immunity**, v. 64, n. 6, p. 1977-1983, 1996.

CHATURVEDI, Vishnu; CHATURVEDI, Sudha. *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen. **Trends in microbiology**, v. 19, n. 11, p. 564-571, 2011

CHEN, Sharon CA et al. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor?. **Journal of Infectious Diseases**, v. 175, n. 2, p. 414-420, 1997

CHEN, Yee-Chun et al. Clinical features and in vitro susceptibilities of two varieties of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 36, n. 3, p. 175-183, 2000.

CHOWDHARY, Anuradha et al. Environmental prevalence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in India: an update. **Critical reviews in microbiology**, v. 38, n. 1, p. 1-16, 2012.

CHRISMAN, Cara J. et al. Phospholipids trigger *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement during interactions with amoebae and macrophages. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 5, p. e1002047, 2011.

CHRISMAN, Cara J.; ALVAREZ, Mauricio; CASADEVALL, Arturo. Phagocytosis and Non-Lytic Exocytosis of *Cryptococcus neoformans* by and from *Acanthamoeba Castellanii*. **Applied and Environmental Microbiology**, pp. 6056–6062, 2010.

COELHO, Carolina et al. Macrophage mitochondrial and stress response to ingestion of *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 5, p. 2345-2357, 2015.

COELHO, Carolina; BOCCA, Anamelia L.; CASADEVALL, Arturo. The intracellular life of *Cryptococcus neoformans*. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 9, p. 219-238, 2014.

COGLIATI, Massimo. Global molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: an atlas of the molecular types. **Scientifica**, v. 2013, 2013.

COSTA, Solange do PSE et al. First isolation of *Cryptococcus gattii* molecular type VGII and *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI from environmental sources in the city of Belém, Pará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 662-664, 2009.

COX, Gary M. et al. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, v. 39, n. 1, p. 166-175, 2001.

CROWE, Suzanne M. et al. Predictive value of CD4 lymphocyte numbers for the development of opportunistic infections and malignancies in HIV-infected persons. **Journal of acquired immune deficiency syndromes**, v. 4, n. 8, p. 770-776, 1991.

DAVIS, Michael J. et al. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. **MBio**, v. 4, n. 3, 2013.

DE OLIVEIRA FRAZÃO, Stefânia et al. Laccase Affects the Rate of *Cryptococcus neoformans* Nonlytic Exocytosis from Macrophages. **Mbio**, v. 11, n. 5, 2020.

DEL POETA, Maurizio. Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic cell**, v. 3, n. 5, p. 1067-1075, 2004.

DEL POETA, Maurizio; CASADEVALL, Arturo. Ten challenges on *Cryptococcus* and cryptococcosis. **Mycopathologia**, v. 173, n. 5-6, p. 303-310, 2012.

DENHAM, S.; BROWN, J. Mechanisms of Pulmonary Escape and Dissemination by *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 1, p. 25, 17 fev. 2018.

DENNING, David W.; HOPE, William W. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. **Trends in microbiology**, v. 18, n. 5, p. 195-204, 2010

DERENGOWSKI, Lorena da S. et al. The transcriptional response of *Cryptococcus neoformans* to ingestion by *Acanthamoeba castellanii* and macrophages provides insights into the evolutionary adaptation to the mammalian host. **Eukaryotic cell**, v. 12, n. 5, p. 761-774, 2013.

DING, Aihao H.; NATHAN, Carl F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **The Journal of Immunology**, v. 141, n. 7, p. 2407-2412, 1988.

DING, Aihao H.; NATHAN, Carl F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **The Journal of Immunology**, v. 141, n. 7, p. 2407-2412, 1988.

DIXIT, A.; CARROLL, S. F.; QURESHI, S. T. *Cryptococcus gattii* : An Emerging Cause of Fungal Disease in North America. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2009, p. 1–13, 2009.

DJORDJEVIC, Julianne. Role of phospholipases in fungal fitness, pathogenicity, and drug development—lessons from *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers in microbiology**, v. 1, p. 125, 2010.

DROMER, F.; BERNEDE-BAUDUIN, C.; GUILLEMOT, D.; LORTHOLARY, O. Major role for amphotericin B-flucytosine combination in severe cryptococcosis. **PLoS ONE**, v.3, 2008..

EISENMAN, Helene C. et al. Cryptococcus neoformans laccase catalyses melanin synthesis from both D-and L-DOPA. **Microbiology**, v. 153, n. 12, p. 3954-3962, 2007.

EISENMAN, Helene C.; CASADEVALL, Arturo. Synthesis and assembly of fungal melanin. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 931-940, 2012.

ELSEGEINY, Waleed; MARR, Kieren A.; WILLIAMSON, Peter R. Immunology of cryptococcal infections: developing a rational approach to patient therapy. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 651, 2018.

EVANS, E. Edward. An immunologic comparison of twelve strains of Cryptococcus neoformans (Torula histolytica). **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 71, n. 4, p. 644-646, 1949.

FAGANELLO, Josiane et al. An alternative method to prepare samples of the pathogenic yeast Cryptococcus neoformans for scanning electron microscopy analysis. **Journal of microbiological methods**, v. 64, n. 3, p. 416-419, 2006

FELDMESSER, Marta et al. Cryptococcus neoformans is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. **Infection and immunity**, v. 68, n. 7, p. 4225-4237, 2000. FELDMESSER, Marta; TUCKER, Stephanie; CASADEVALL, Arturo. Intracellular parasitism of macrophages by Cryptococcus neoformans. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 6, p. 273-278, 2001.

FENG, Bin et al. Molecular cloning and characterization of WdPKS1, a gene involved in dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis and virulence in Wangiella (Exophiala) dermatitidis. **Infection and immunity**, v. 69, n. 3, p. 1781-1794, 2001.

FERREIRA-PAIM, Kennio et al. Antifungal susceptibility, enzymatic activity, PCR-fingerprinting and ITS sequencing of environmental Cryptococcus laurentii isolates from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Mycopathologia**, v. 174, n. 1, p. 41-52, 2012.

FERREIRA-PAIM, Kennio et al. MLST-based population genetic analysis in a global context reveals clonality amongst Cryptococcus neoformans var. grubii

VNI isolates from HIV patients in Southeastern Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 1, p. e0005223, 2017.

FIRACATIVE, C. et al. The status of cryptococcosis in Latin America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 113, n. 7, 2018. Disponível em: <https://bit.ly/2JC3I7R>. Acesso em: 2 set. 2018.

FIRACATIVE, Carolina; DUAN, Shuyao; MEYER, Wieland. Galleria mellonella model identifies highly virulent strains among all major molecular types of *Cryptococcus gattii*. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e105076, 2014..

FORTES, Silvana T. et al. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. **Mycoses**, v. 44, n. 5, p. 137-140, 2001.

FRIES, Bettina C. et al. Phenotypic switching of *Cryptococcus neoformans* occurs in vivo and influences the outcome of infection. **The Journal of clinical investigation**, v. 108, n. 11, p. 1639-1648, 2001.

FROMTLING, R. A. et al. Serotype B/C *Cryptococcus neoformans* isolated from patients in nonendemic areas. **Journal of clinical microbiology**, v. 16, n. 2, p. 408-410, 1982.

GAGO, Sara et al. High-resolution melting analysis for identification of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* complex. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 10, p. 3663-3666, 2011.

GALANIS, Eleni et al. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999–2007. **Emerging infectious diseases**, v. 16, n. 2, p. 251, 2010.

GHANNOUM, Mahmoud A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clinical microbiology reviews**, v. 13, n. 1, p. 122-143, 2000.

GIBSON, Josie F.; JOHNSTON, Simon A. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 76-86, 2015.

GORDON, S. B.; READ, R. C. Macrophage defences against respiratory tract infections: The immunology of childhood respiratory infections. **British medical bulletin**, v. 61, n. 1, p. 45-61, 2002.

GORDON, S. B.; READ, R. C. Macrophage defences against respiratory tract infections: The immunology of childhood respiratory infections. **British medical bulletin**, v. 61, n. 1, p. 45-61, 2002.

GOULART, Letícia Silveira. Genes diferencialmente expressos por *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* durante a infecção de macrófagos. 2009.

GRAHNERT, Andreas et al. IL-4 receptor-alpha-dependent control of *Cryptococcus neoformans* in the early phase of pulmonary infection. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e87341, 2014.

GRIFFIN, Frank M. Roles of macrophage Fc and C3b receptors in phagocytosis of immunologically coated *Cryptococcus neoformans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 6, p. 3853-3857, 1981.

HAGEN, Ferry et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 16-48, 2015.

HANSAKON, Adithap et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* clinical isolates from Thailand display diverse phenotypic interactions with macrophages. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 26-36, 2019.

HARRIS, Julie R. et al. *Cryptococcus gattii* infections in multiple states outside the US Pacific Northwest. **Emerging infectious diseases**, v. 19, n. 10, p. 1621, 2013.

HEISS, Christian et al. The structure of *Cryptococcus neoformans* galactoxylomannan contains β -D-glucuronic acid. **Carbohydrate research**, v. 344, n. 7, p. 915-920, 2009

HERRING, Amy C. et al. Induction of interleukin-12 and gamma interferon requires tumor necrosis factor alpha for protective T1-cell-mediated immunity to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. **Infection and immunity**, v. 70, n. 6, p. 2959-2964, 2002.

HILL, Helene Z. The function of melanin or six blind people examine an elephant. **Bioessays**, v. 14, n. 1, p. 49-56, 1992.

HU, Xiaoyu et al. Sensitization of IFN- γ Jak-STAT signaling during macrophage activation. **Nature immunology**, v. 3, n. 9, p. 859-866, 2002

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

HUFFNAGLE, Gary B. et al. IL-5 is required for eosinophil recruitment, crystal deposition, and mononuclear cell recruitment during a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection in genetically susceptible mice (C57BL/6). **The Journal of Immunology**, v. 160, n. 5, p. 2393-2400, 1998.

HUFFNAGLE, Gary B. et al. The role of CD4+ and CD8+ T cells in the protective inflammatory response to a pulmonary cryptococcal infection. **Journal of leukocyte biology**, v. 55, n. 1, p. 35-42, 1994.

HUFFNAGLE, Gary B. et al. The role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the recruitment of monocytes and CD4+ T cells during a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. **The Journal of Immunology**, v. 155, n. 10, p. 4790-4797, 1995.

HUFFNAGLE, Gary B. Role of cytokines in T cell immunity to a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. **Neurosignals**, v. 5, n. 4, p. 215-222, 1996.

HUFFNAGLE, Gary B.; YATES, J. L.; LIPSCOMB, Mary F. Immunity to a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection requires both CD4+ and CD8+ T cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 173, n. 4, p. 793-800, 1991.

HULL, Christina M.; HEITMAN, Joseph. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. **Annual review of genetics**, v. 36, n. 1, p. 557-615, 2002.

HUSSELL, Tracy; BELL, Thomas J. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. **Nature reviews immunology**, v. 14, n. 2, p. 81-93, 2014.

HUSTON, Shauna M. et al. *Cryptococcus gattii* is killed by dendritic cells, but evades adaptive immunity by failing to induce dendritic cell maturation. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 1, p. 249-261, 2013.

IDNURM, Alexander et al. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 753-764, 2005.

JAIN, N. et al. Molecular Epidemiology of Clinical *Cryptococcus neoformans* Strains from India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5733–5742, 1 nov. 2005.

JENNEY, Adam et al. *Cryptococcus* infection in tropical Australia. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3865-3868, 2004.

KARKOWSKA-KULETA, Justyna; RAPALA-KOZIK, Maria; KOZIK, Andrzej. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 2, 2009.

KAWAKAMI, Kazuyoshi et al. Monocyte chemoattractant protein-1-dependent increase of V α 14 NKT cells in lungs and their roles in Th1 response and host defense in cryptococcal infection. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 11, p. 6525-6532, 2001. KHAWCHAROENPORN T, et al. Non-*neoformans* Cryptococcal Infections: a Systematic Review. **Infection**, n 35(2): p 51-8, 2007.

KIDD, S.E.; CHOW, Y.; MAK, S.; BACH, P. J.; CHEN, H.; et al. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, p. 1433–1443, 2007.

KON, A.S.; et al. Consenso em *Criptococose*. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.41, pp. 524-44, 2008.

KOZEL, T. R.; PFROMMER, G. S.; REDELMAN, D. Activated neutrophils exhibit enhanced phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* opsonized with normal human serum. **Clinical and experimental immunology**, v. 70, n. 1, p. 238, 1987.

KOZEL, Thomas R.; BAUMAN, Sean K. CrAg lateral flow assay for cryptococcosis. **Expert opinion on medical diagnostics**, v. 6, n. 3, p. 245-251, 2012.

KRAUS, Peter R. et al. Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with a genomic-DNA microarray. **Eukaryotic cell**, v. 3, n. 5, p. 1249-1260, 2004.

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

KWON-CHUNG, K. J. A new genus, Filobasidiella, the perfect state of Cryptococcus neoformans. **Mycologia**, v. 67, n. 6, p. 1197-1200, 1975.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, John E. Distribution of α and α mating types of Cryptococcus neoformans among natural and clinical isolates. **American Journal of Epidemiology**, v. 108, n. 4, p. 337-340, 1978.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHEK, I.; POPKIN, T. J. Melanin-lacking mutants of Cryptococcus neoformans and their virulence for mice. **Journal of bacteriology**, v. 150, n. 3, p. 1414-1421, 1982.

KWON-CHUNG, Kyung J.; POLACHEK, ITZHACK; BENNETT, JOHN E. Improved diagnostic medium for separation of Cryptococcus neoformans var. neoformans (serotypes A and D) and Cryptococcus neoformans var. gattii (serotypes B and C). **Journal of clinical microbiology**, v. 15, n. 3, p. 535-537, 1982.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica**. 9 ed. São Paulo: Savier; 2002.

LANGFELDER, Kim et al. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. **Fungal genetics and biology**, v. 38, n. 2, p. 143-158, 2003.

LASS-FLÖRL, Cornelia et al. Antifungal activity against Candida species of the selective serotonin-reuptake inhibitor, sertraline. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 12, p. e135-e136, 2001.

LAZERA, M. S. et al. Possible primary ecological niche of Cryptococcus neoformans. **Medical mycology**, v. 38, n. 5, p. 379-383, 2000

LEAL, A. L. **Diferenciação das espécies Cryptococcus neoformans e Cryptococcus gattii utilizando a metodologia de PCR multiplex e determinação do perfil epidemiológico de pacientes com meningite criptocócica**. 38 2006.100f.Dissertação (Mestrado Biologia Celular e Molecular) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

LEGGIADRO, Robert J.; BARRETT, Fred F.; HUGHES, Walter T. Extrapulmonary cryptococcosis in immunocompromised infants and children. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 11, n. 1, p. 43-47, 1992.

LEOPOLD WAGER, Chrissy M. et al. Cryptococcus and phagocytes: complex interactions that influence disease outcome. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 105, 2016.

LESTER, Sally J. et al. Cryptococcosis: update and emergence of *Cryptococcus gattii*. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40, n. 1, p. 4-17, 2011.

LEVITZ, Stuart M. *Cryptococcus neoformans*: intracellular or extracellular?. **TRENDS in Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 417-418, 2001.

LEVITZ, Stuart M. et al. *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. **Infection and immunity**, v. 67, n. 2, p. 885-890, 1999.

LI, Shu Shun; MODY, Christopher H. *Cryptococcus*. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 7, n. 3, p. 186-196, 2010.

LIN, Xiaorong et al. α AD α hybrids of *Cryptococcus neoformans*: evidence of same-sex mating in nature and hybrid fitness. **PLoS Genet**, v. 3, n. 10, p. e186, 2007.

LIN, Xiaorong; HEITMAN, Joseph. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 60, p. 69-105, 2006.

Lindell D. M., Moore T. A., McDonald R. A., Toews G. B., Huffnagle G. B., 2005.

LINDELL, Dennis M. et al. Generation of antifungal effector CD8⁺ T cells in the absence of CD4⁺ T cells during *Cryptococcus neoformans* infection. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 12, p. 7920-7928, 2005.

LOCKHART, S. R.; IQBAL, N.; et al. *Cryptococcus gattii* in the United States: Genotypic Diversity of Human and Veterinary Isolates. **PLoS ONE**, v. 8, p. 1, 2013.

LOPES, José Pedro et al. *Cryptococcus neoformans* Induces MCP-1 Release and Delays the Death of Human Mast Cells. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, p. 289, 2019.

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

LUBERTO, Chiara et al. Identification of App1 as a regulator of phagocytosis and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of clinical investigation**, v. 112, n. 7, p. 1080-1094, 2003.

LUTZ, Manfred B. et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. **Journal of immunological methods**, v. 223, n. 1, p. 77-92, 1999.

MA, Hansong et al. Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages. **Current Biology**, v. 16, n. 21, p. 2156-2160, 2006.

MA, Hansong; MAY, Robin C. Virulence in *Cryptococcus* species. **Advances in applied microbiology**, v. 67, p. 131-190, 2009.

MACURA, Nataša; ZHANG, Tong; CASADEVALL, Arturo. Dependence of macrophage phagocytic efficacy on antibody concentration. **Infection and immunity**, v. 75, n. 4, p. 1904-1915, 2007.

MARTINEZ, Luis R.; CASADEVALL, Arturo. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 3, p. 1021-1033, 2006.

MARTINEZ, Luis R.; GARCIA-RIVERA, Javier; CASADEVALL, Arturo. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) strains are more susceptible to heat than *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A) strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3365-3367, 2001.

MARTINS, L. M. S.; WANKE, B.; LAZÉRA, M. DOS S.; TRILLES, L.; BARBOSA, G. G.; MACEDO, R. C. L. DE.; CAVALCANTI, M. D. O. A.; EULÁLIO, K. D.; CASTRO, J. A.; SILVA, A. S.; NASCIMENTO, F. F.; GOUVEIA, V. A.; MONTE, S. J. Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piauí (northeastern Brazil). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 106:725–730, 2011.

MAY, Robin C. et al. Cryptococcus: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 106-117, 2016.

MAZIARZ, Eileen K.; PERFECT, John R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 179-206, 2016.

MCFADDEN, Diane C. et al. Capsule structural heterogeneity and antigenic variation in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 8, p. 1464-1473, 2007.

MITCHELL, Thomas G.; PERFECT, John R. Cryptococcosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical microbiology reviews**, v. 8, n. 4, p. 515-548, 1995.

MONGA, DHARAM P. Role of macrophages in resistance of mice to experimental cryptococcosis. **Infection and immunity**, v. 32, n. 3, p. 975-978, 1981.

MORA, Delio José et al. Cytokine patterns in a prospective cohort of HIV-infected patients with cryptococcal meningitis following initiation of antifungal and antiretroviral therapy. **PLoS One**, v. 12, n. 5, p. e0176304, 2017.

MOSSER, David M.; EDWARDS, Justin P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature reviews immunology**, v. 8, n. 12, p. 958-969, 2008.

MYLONAKIS, Eleftherios et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Infection and immunity**, v. 73, n. 7, p. 3842-3850, 2005
NOSANCHUK, Joshua D.; CASADEVALL, Arturo. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cellular microbiology**, v. 5, n. 4, p. 203-223, 2003.

MYLONAKIS, Eleftherios et al. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 24, p. 15675-15680, 2002.

NOSANCHUK, Joshua Daniel; OVALLE, Rafael; CASADEVALL, Arturo. Glyphosate inhibits melanization of *Cryptococcus neoformans* and prolongs survival of mice after systemic infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 183, n. 7, p. 1093-1099, 2001.

ODOM, Audrey et al. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **The EMBO journal**, v. 16, n. 10, p. 2576-2589, 1997.

OKABAYASHI, Ken et al. Expression of capsule-associated genes of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, v. 160, n. 1, p. 1-7, 2005.

OLIVEIRA, L. de. **Estudo de características dos agentes de criptococose: genótipos, polimorfismo, melanização e suscetibilidade a antifúngicos**. Dissertação (Mestrado em Ciências) Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo-PPG-CCD-SES/SP, 114 p, 2015.

OLIVEIRA, L. et al. Time-Kill Curves Studies with Amphotericin B Against *Cryptococcus neoformans*/C. gattiii Species Complex Clinical Isolates. **Current Fungal Infection Reports**, v. 11, n. 4, p. 158–162, dez. 2017.

OLIVEIRA, R. V. et al. Regional Pattern of the Molecular Types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattiii* in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103(5), p. 455– 462, 2008.

OLSZEWSKI, M.A. et al. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. **Am J Pathol**, v.164, n.5, pp.1761-71, 2004.

O'MEARA, Teresa R. et al. *Cryptococcus neoformans* Rim101 is associated with cell wall remodeling and evasion of the host immune responses. **MBio**, v. 4, n. 1, 2013.

O'MEARA, Teresa R.; ALSPAUGH, J. Andrew. The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. **Clinical microbiology reviews**, v. 25, n. 3, p. 387-408, 2012.

OSTERHOLZER, J. J. et al. Role of dendritic cells and alveolar macrophages in regulating early host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 9, p. 3749–3755, 2009.

PAPPALARDO, Mara CSM; MELHEM, Márcia SC. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 6, p. 299-305, 2003.

PAPPAS, Peter G. Cryptococcal infections in non-HIV-infected patients. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v. 124, p. 61, 2013.

PARK, Benjamin J. et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **Aids**, v. 23, n. 4, p. 525-530, 2009.

PASA, Chrystiane Rodrigues. Tipagem molecular e suscetibilidade antifúngica de *Cryptococcus* isolados de pacientes em hospital universitário com investigação domiciliar. 2011

PAULA, C. R. et al. *Cryptococcus gattii*: Immunological and Microbiological Study in a Patient with Neurocryptococcosis. **JMM Case Reports**, v. 2, n. 5, 9 out. 2015.

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

PERFECT, John R.; CASADEVALL, Arturo. Cryptococcosis. **Infectious disease clinics of North America**, v. 16, n. 4, p. 837-74, v, 2002.

PERFECT, John R.; COX, Gary M. Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Drug Resistance Updates**, v. 2, n. 4, p. 259-269, 1999.

PINTO JUNIOR, Vitor Laerte et al. *Cryptococcus gattii* tipo molecular VGII como agente causador de meningoencefalite em criança saudável no Rio de Janeiro, Brasil: relato de um caso autóctone. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p. 746-748, 2010.

POLACHEK, Itzhack; KWON-CHUNG, Kyung Joo. Melanogenesis in *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 134, n. 4, p. 1037-1041, 1988.

PONGSAI, Pannee; ATAMASIRIKUL, Kalayanee; SUNGKANUPARPH, Somnuek. The role of serum cryptococcal antigen screening for the early diagnosis of cryptococcosis in HIV-infected patients with different ranges of CD4 cell counts. **Journal of Infection**, v. 60, n. 6, p. 474-477, 2010.

PORCHERAY, F. et al. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 142, n. 3, p. 481-489, 2005.

PORCHERAY, F. et al. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 142, n. 3, p. 481-489, 2005. QUEIROZ, J.P.A. F.; SOUSA, F.D.N.; LAGE, R.A et al. Criptococose: uma revisão bibliográfica. **Acta Vet. Bras.**, v.2, p.32-8, 2008.

RAJASINGHAM, Radha et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet infectious diseases**, v. 17, n. 8, p. 873-881, 2017
RETINI, Cinzia et al. Capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* induces proinflammatory cytokine release by human neutrophils. **Infection and immunity**, v. 64, n. 8, p. 2897-2903, 1996.

RIBAS, R.C.; BAEZA, L.C.; RIBEIRO, F.H M. . Isolation of *Cryptococcus* spp. in excrements of pigeons (*Columba* sp.) in the Maringa city, PR, Brazil. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, v.15, p.45-50, 2011.

RICHARDSON, Malcolm; LASS-FLÖRL, C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 5-24, 2008.

RODRIGUES, Marcio L. et al. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 1, p. 58-67, 2008.

SABIITI, Wilber et al. Efficient phagocytosis and laccase activity affect the outcome of HIV-associated cryptococcosis. **The Journal of clinical investigation**, v. 124, n. 5, p. 2000-2008, 2014.

SABIITI, Wilber et al. Efficient phagocytosis and laccase activity affect the outcome of HIV-associated cryptococcosis. **The Journal of clinical investigation**, v. 124, n. 5, p. 2000-2008, 2014.

SABIITI, Wilber; MAY, Robin C. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Future microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1297-1313, 2012.

SADEGHI, Hoss M. et al. Phenotypic and functional characteristics of circulating monocytes of elderly persons. **Experimental gerontology**, v. 34, n. 8, p. 959-970, 1999.

SADEGHI, S.; WALLACE, F. A.; CALDER, P. C. Dietary lipids modify the cytokine response to bacterial lipopolysaccharide in mice. **Immunology**, v. 96, n. 3, p. 404, 1999.

SALAS, S. D. et al. Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of experimental medicine**, v. 184, n. 2, p. 377-386, 1996. SANTANGELO, Rosemary et al. Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model. **Infection and immunity**, v. 72, n. 4, p. 2229-2239, 2004.

SANTOS, W. R.; MEYER, W.; WANKE, B.; COSTA, S. P.; TRILLES, L.; NASCIMENTO, J. L.; MEDEIROS, R.; MORALES, B. P.; BEZERRA, C. DE. C.; MACEDO, R. C.; FERREIRA, S. O.; BARBOSA, G. G.; PEREZ, M. A.; NISHIKAWA, M. M.; LAZERA, M. S. Primary endemic *Cryptococcus gattii* by molecular type vgii in the state of Pará, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 8, p. 813-818, dec, 2008.

SCHOFFELEN, Teske et al. *Cryptococcus gattii* induces a cytokine pattern that is distinct from other cryptococcal species. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e55579, 2013.

SEVERO, C. B.; GAZZONI, A. F.; SEVERO, L. C. Capítulo 3 - Criptococose pulmonar. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 35, n. 11, p. 1136–1144, 2009. 41 SHI, M. et al. Real-time imaging of trapping and urease- dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 5, p. 1683–1693, 2010.

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

SHIMIZU, Takeo; ITO, Tsutae; KANEMATSU, Satoko. Functional analysis of a melanin biosynthetic gene using RNAi-mediated gene silencing in *Rosellinia necatrix*. **Fungal biology**, v. 118, n. 4, p. 413-421, 2014.

SINGH, Arpita et al. Factors required for activation of urease as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans*. **MBio**, v. 4, n. 3, 2013.

SKIPPER, Caleb; ABASSI, Mahsa; BOULWARE, David R. Diagnosis and management of central nervous system cryptococcal infections in HIV-infected adults. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 3, p. 65, 2019.

SORRELL, Tania C.; ELLIS, David H. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 14, p. 42-43, 1997.

SPITZER, Michaela; ROBBINS, Nicole; WRIGHT, Gerard D. Combinatorial strategies for combating invasive fungal infections. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 169-185, 2017.

SRIKANTA, Deepa; SANTIAGO-TIRADO, Felipe H.; DOERING, Tamara L. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. **Yeast**, v. 31, n. 2, p. 47-60, 2014. Steenbergen, J. N.; Shuman, H. A.; Casadevall, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2001 Dec. 98; 26: 15245- 50.

STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, Arturo. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 26, p. 15245-15250, 2001.

STEENBERGEN, Judith N.; CASADEVALL, Arturo. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Microbes and infection**, v. 5, n. 7, p. 667-675, 2003.

STEVENS, David A. Diagnosis of fungal infections: current status. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. suppl_1, p. 11-19, 2002.

STOUT, Robert D. et al. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 1, p. 342-349, 2005

SUN, Donglei et al. Intravascular clearance of disseminating *Cryptococcus neoformans* in the brain can be improved by enhancing neutrophil recruitment in mice. **European journal of immunology**, v. 46, n. 7, p. 1704-1714, 2016.

TAKASHIMA, Masako et al. Reclassification of the *Cryptococcus humicola* complex. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2199-2210, 2001.

TAKASHIMA, Masako et al. Three new combinations from the *Cryptococcus laurentii* complex: *Cryptococcus aureus*, *Cryptococcus carnescens* and *Cryptococcus peneaus*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 1187-1194, 2003.

TINTELNOT, K.; SCHÄR, G.; POLAK, A. Epidemiological data of cryptococcosis in Austria, Germany and Switzerland: part of the ECMM survey in Europe. **Mycoses**, v. 44, n. 9-10, p. 345-350, 2001.

TRILLES, Luciana et al. Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. **Medical mycology**, v. 41, n. 5, p. 383-390, 2003.

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

TUCKER, Stephanie C.; CASADEVALL, Arturo. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 5, p. 3165-3170, 2002.

UPADHYA, Rajendra et al. Induction of protective immunity to cryptococcal infection in mice by a heat-killed, chitosan-deficient strain of *Cryptococcus neoformans*. **MBio**, v. 7, n. 3, 2016.

VAN DUIN, David; CASADEVALL, Arturo; NOSANCHUK, Joshua D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3394-3400, 2002.

Van Dyken S. J., Locksley R. M., 2013. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. *Annu. Rev. Immunol.* v.31, pp.317–343.

VECCHIARELLI, Anna et al. Cryptococcus neoformans galactoxylomannan is a potent negative immunomodulator, inspiring new approaches in anti-inflammatory immunotherapy. **Immunotherapy**, v. 3, n. 8, p. 997-1005, 2011.

VOELZ, Kerstin; LAMMAS, David A.; MAY, Robin C. Cytokine signaling regulates the outcome of intracellular macrophage parasitism by Cryptococcus neoformans. **Infection and immunity**, v. 77, n. 8, p. 3450-3457, 2009.

WAGER, Chrissy M. Leopold; WORMLEY JR, Floyd L. Is development of a vaccine against Cryptococcus neoformans feasible?. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 6, p. e1004843, 2015.

WANG, Yulin; AISEN, Philip; CASADEVALL, Arturo. Cryptococcus neoformans melanin and virulence: mechanism of action. **Infection and immunity**, v. 63, n. 8, p. 3131-3136, 1995.

WASAN, K.M.; CONKLIN, J.S.. Enhanced amphotericin B nephrotoxicity in intensive care patients with elevated levels of low-density lipoprotein cholesterol. **Clin. Infect. Dis.** V.24, pp.78-80, 1997.

WATANABE, Akira et al. Aspergillus fumigatus alb1 encodes naphthopyrone synthase when expressed in Aspergillus oryzae. **FEMS microbiology letters**, v. 192, n. 1, p. 39-44, 2000. WHO. Guidelines for the diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children: supplement to the 2016 consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. 2018.

Wilson JW. Cryptococcosis; torulosis, European blastomycosis, BusseBuschke's disease. *J Chronic Dis.* 1957 Apr;5(4):455-59. PubMed PMID: 13416357.

WOZNIAK, Karen L.; LEVITZ, Stuart M. Cryptococcus neoformans enters the endolysosomal pathway of dendritic cells and is killed by lysosomal components. **Infection and immunity**, v. 76, n. 10, p. 4764-4771, 2008.

WOZNIAK, Karen L.; YOUNG, Mattie L.; WORMLEY, Floyd L. Protective immunity against experimental pulmonary cryptococcosis in T cell-depleted mice. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 5, p. 717-723, 2011.

ZARAGOZA, Oscar et al. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2043-2057, 2008.

ZARAGOZA, Oscar et al. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Advances in applied microbiology**, v. 68, p. 133-216, 2009

ZARAGOZA, Oscar; CASADEVALL, Arturo. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. **Biological procedures online**, v. 6, n. 1, p. 10-15, 2004.

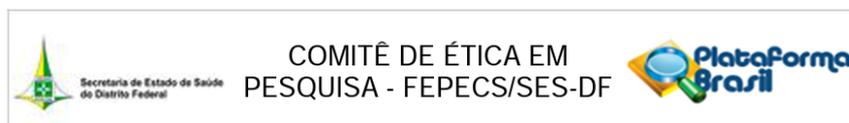
ZARAGOZA, Oscar; TABORDA, Carlos P.; CASADEVALL, Arturo. The efficacy of complement-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* is dependent on the location of C3 in the polysaccharide capsule and involves both direct and indirect C3-mediated interactions. **European journal of immunology**, v. 33, n. 7, p. 1957-1967, 2003.

ZHANG, Yanmei et al. Robust Th1 and Th17 immunity supports pulmonary clearance but cannot prevent systemic dissemination of highly virulent *Cryptococcus neoformans* H99. **The American journal of pathology**, v. 175, n. 6, p. 2489-2500, 2009.

ZHU, Xudong; WILLIAMSON, Peter R. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **FEMS yeast research**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2004.

Anexo 1

Comprovação de autorização do comitê de ética para uso dos isolados e dados clínicos dos pacientes



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DA CRIPTOCOCOSE NO BRASIL: CRIAÇÃO DE UMA REDE INTEGRADA DE PESQUISA MULTIDISCIPLINAR NO DISTRITO FEDERAL.

Pesquisador: Vitor Laerte Pinto Junior

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 37904214.7.3001.5553

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: Fundação Oswaldo Cruz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 979.140

Data da Relatoria: 23/02/2015

Apresentação do Projeto:

Inalterado em relação ao PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_942633%20(1) do CEP/FEPECS/SES/DF DO DIA 02/02/2015.

Objetivo da Pesquisa:

Inalterado em relação ao PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_942633%20(1) do CEP/FEPECS/SES/DF DO DIA 02/02/2015.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Inalterado em relação ao PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_942633%20(1) do CEP/FEPECS/SES/DF DO DIA 02/02/2015.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Inalterado em relação ao PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_942633%20(1) do CEP/FEPECS/SES/DF DO DIA 02/02/2015.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Inalterado em relação ao PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_942633%20(1) do CEP/FEPECS/SES/DF DO DIA 02/02/2015.

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS
Bairro: ASA NORTE **CEP:** 70.710-904
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3325-4955 **Fax:** (33)3325-4955 **E-mail:** comitedeetica.secretaria@gmail.com



Continuação do Parecer: 979.140

Recomendações:

Inalterado em relação ao PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_942633%20(1) do CEP/FEPECS/SES/DF DO DIA 02/02/2015.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Inalterado em relação ao PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_942633%20(1) do CEP/FEPECS/SES/DF DO DIA 02/02/2015.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

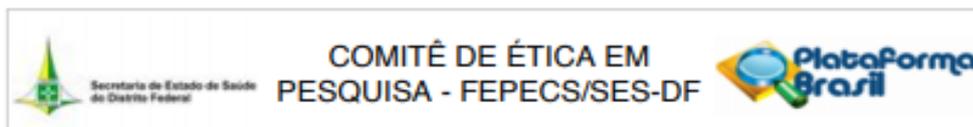
Considerações Finais a critério do CEP:

BRASILIA, 10 de Março de 2015

Assinado por:
Helio Bergo
(Coordenador)

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS
Bairro: ASA NORTE **CEP:** 70.710-904
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3325-4955 **Fax:** (33)3325-4955 **E-mail:** comitedeetica.secretaria@gmail.com





PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DA CRIPTOCOCOSE NO BRASIL: CRIAÇÃO DE UMA REDE INTEGRADA DE PESQUISA MULTIDISCIPLINAR NO DISTRITO FEDERAL.

Pesquisador: Vitor Laerte Pinto Junior

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 37904214.7.1001.5553

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: Fundação Oswaldo Cruz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 942.633

Data da Relatoria: 01/02/2015

Apresentação do Projeto:

Sem alterações em relação ao Parecer número 881.498 de 09/11/2014.

Objetivo da Pesquisa:

Sem alterações em relação ao Parecer número 881.498 de 09/11/2014.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem alterações em relação ao Parecer número 881.498 de 09/11/2014.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem alterações em relação ao Parecer número 881.498 de 09/11/2014.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os Termos de apresentação obrigatória foram devidamente apresentados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências e inadequação resolvidas.

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS
Bairro: ASA NORTE **CEP:** 70.710-904
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3325-4955 **Fax:** (33)3325-4955 **E-mail:** comitedeetica.secretaria@gmail.com



Continuação do Parecer: 882.291

fatores predisponentes associados

3- Descrever os fatores de risco para aquisição de criptococose de acordo com as características geográficas regionais e perfil do agente envolvido.

4- Identificar os fatores associados aos diversos desfechos clínicos e viabilizar a construção de subprojetos para estudá-los:

5-Monitorar o perfil de sensibilidade in vitro aos antifúngicos dos agentes etiológicos da criptococose e determinar seus tipos moleculares.

6-Promover a validação dos protocolos diagnósticos mais eficientes, visando diagnóstico precoce dos casos.

7-Promover a validação de protocolos terapêuticos mais efetivos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Foi apresentado que não há riscos éticos na pesquisa, o que não está de acordo com a Resolução CNS 266 de 2012. Os benefícios arrolados estão adequados ao estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo descritivo retrospectivo de base hospitalar de pacientes com diagnóstico de criptococose. A captação de indivíduos ocorrerá através das Unidades participantes da Rede Criptococose Brasil no DF a partir de 2007, posteriormente esse estudo será continuado de forma prospectiva com intuito de se manter uma coorte clínica. Local: SES-DF, Hospital Regional de Taguatinga e Hospital Universitário de Brasília.

Tamanho da mostra: 100 indivíduos no DF. População do estudo: indivíduos com diagnóstico clínico – laboratorial de criptococose primária ou associada a co-infecção pelo HIV ou a outros fatores predisponentes – doenças malignas, transplantes, diabetes, uso de corticoide e/ou outros imunossuppressores e imunobiológicos (rituximab, etc), cirrose, doenças inflamatórias crônicas, tuberculose, gravidez e outros). Os critérios de inclusão e de exclusão foram apresentados. Haverá retenção de amostras de *Cryptococcus* sp.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram adequadamente apresentados: Folha de Rosto, Termos de Concordância e TCLE. Há o orçamento, entretanto não há termo de garantia ou informação sobre a fonte do custeio.

Faltam os currículos dos pesquisadores.

Falta o instrumento de coleta de dados.

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS
Bairro: ASA NORTE **CEP:** 70.710-904
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3325-4955 **Fax:** (33)3325-4955 **E-mail:** comitedeetica.secretaria@gmail.com

Página 02 de 03



Continuação do Parecer: 882.291

Recomendações:

A coleta de dados deve se iniciar apenas após a aprovação do CEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Deve ser retirada a informação que não há riscos, pois todo estudo com seres humanos traz algum risco e potencial.

Solicita-se apresentar: termo de garantia do orçamento, currículos dos pesquisadores e o instrumento de coleta de dados.

Situação do Parecer:

Pendente

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

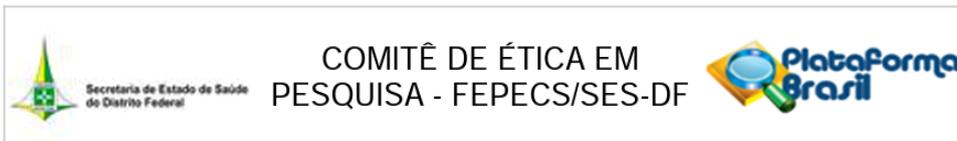
Considerações Finais a critério do CEP:

BRASILIA, 24 de Novembro de 2014

Assinado por:
LUIZ FERNANDO GALVÃO SALINAS
(Coordenador)

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS
Bairro: ASA NORTE **CEP:** 70.710-904
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3325-4955 **Fax:** (33)3325-4955 **E-mail:** comitedeetica.secretaria@gmail.com

Página 03 de 03



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - FEPECS/SES-DF



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DA CRIPTOCOCOSE NO BRASIL: CRIAÇÃO DE UMA REDE INTEGRADA DE PESQUISA MULTIDISCIPLINAR NO DISTRITO FEDERAL.

Pesquisador: Vitor Laerte Pinto Junior

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 37904214.7.1001.5553

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: Fundação Oswaldo Cruz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 882.291

Data da Relatoria: 09/11/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo multicêntrico nacional, com 100 participantes, baseando-se que no Brasil faltam estudos epidemiológicos sistematizados sobre a criptococose. A criptococose é micose emergente e cosmopolita e o diagnóstico tardio é marcante. Há poucos registros de formas pulmonares, provavelmente pouco diagnosticadas, resultando em sub-notificação. Não constitui doença de notificação obrigatória, entretanto causa cerca de um milhão de casos de meningoencefalite por ano em pacientes com Aids em todo mundo, com aproximadamente 625.000 óbitos, bem como a micose sistêmica em indivíduos aparentemente normais.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL

Descrever o perfil clínico e epidemiológico e evolução da criptococose no Brasil por meio da criação da implantação da rede integrada de pesquisa multidisciplinar de criptococose no Distrito Federal abrangendo a criptococose primária e oportunista.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1-Criar e manter sistema de monitoramento da criptococose no Distrito Federal por meio da atuação em rede dos órgãos envolvidos.

1-Determinar as características clínicas e laboratoriais da criptococose em hospedeiro com e sem

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS

Bairro: ASA NORTE

CEP: 70.710-904

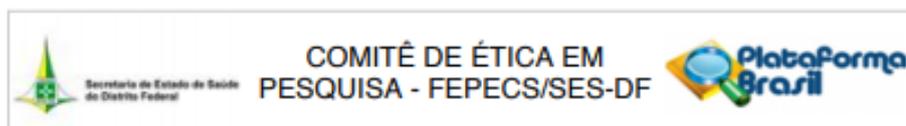
UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3325-4955

Fax: (33)3325-4955

E-mail: comitedeetica.secretaria@gmail.com



Continuação do Parecer: 942.533

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

BRASILIA, 02 de Fevereiro de 2015

Assinado por:
Helio Bergo
(Coordenador)

Anexo 2

Comprovação de autorização pelo Comitê de Ética de uso de animais



Universidade de Brasília
 Instituto de Ciências Biológicas
 Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 10 de setembro de 2012.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"CARACTERIZAÇÃO DAS BASES MOLECULARES DA SUSCETIBILIDADE IMUNOLÓGICA À INFECÇÃO SISTÊMICA."**, UnBDOC n.º 52657/2011, sob responsabilidade da Profa. Ildinete Silva Pereira foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.






 Prof. José Raimundo Corrêa
 Coordenador da CEUA

Anexo 3

Tabela 1. Dados gerais dos isolados clínicos como, espécie, nomenclatura, percentual de fagocitose, sobrevivência fúngica, índice fagocítico, e concentração das citocinas IL-6, TNF- α e a quimiocina MCP-1.

Isolado	Espécie	Procedência	% Fagocitose	Índice fagocítico IF	Sobrevivência Fúngica CFU	[] IL-6 pg/mL	[] TNF- α pg/mL	[] MCP1 pg/mL
H99 Controle	<i>C. neoformans</i>	Laboratório	54,7	4,2	0,5	623,2	1542	204
B3501 Controle	<i>C. neoformans</i>	Laboratório	63,7	3,5	0,3	575,3	1413	211
CNF001. 1	<i>C. neoformans</i>	FIOCRUZ Rio de Janeiro	56,3	3,5	0,3	529,4	730,8	229
CNF002	<i>C. neoformans</i>	FIOCRUZ Rio de Janeiro	49,3	1,2	0,5	517,1	879,6	225
CNF003	<i>C. neoformans</i>	FIOCRUZ Rio de Janeiro	52,0	4,5	0,30	616,7	745,1	244
CNF004	<i>C. neoformans</i>	FIOCRUZ Rio de Janeiro	36,3	4,2	0,2	1075,1	818,5	259
CNF005	<i>C. neoformans</i>	FIOCRUZ Rio de Janeiro	37,7	3,2	0,4	1028,2	641,3	186
CNF001. 2	<i>C. neoformans</i>	FIOCRUZ Rio de Janeiro	67,7	2,6	0,2	958,0	754,8	252
CNF007	<i>C. neoformans</i>	FIOCRUZ Rio de Janeiro	72,7	3,6	0,3	1141,2	742,9	220
CNF008	<i>C. neoformans</i>	FIOCRUZ Rio de Janeiro	57,3	4,2	0,3	630,7	634,7	226
CNF001. 3	<i>C. neoformans</i>	FIOCRUZ Rio de Janeiro	56,3	4,43	0,2	752,9	666,1	236

CNF010	<i>C. neoformans</i>	FIOCRUZ Rio de Janeiro	60,0	4,46	0,2	724,7	584,1	184
CNF011	<i>C. neoformans</i>	FIOCRUZ Rio de Janeiro	60,7	3,6	1,0	528,3	947,4	92
CNF012	<i>C. neoformans</i>	FIOCRUZ Rio de Janeiro	64,0	3,2	0,3	656,4	964,3	234
CNF013	<i>C. neoformans</i>	FIOCRUZ Rio de Janeiro	70,0	4,25	1,5	765,5	800,5	229
CNF014. 1	<i>C. neoformans</i>	FIOCRUZ Rio de Janeiro	79,7	2,30	1,3	319,3	720,8	217
CNF014. 2	<i>C. neoformans</i>	FIOCRUZ Rio de Janeiro	76,0	3,4	1,4	271,1	674,7	40
CNF016	<i>C. neoformans</i>	FIOCRUZ Rio de Janeiro	57,3	4,42	1,0	520,2	786,5	241
CGF001	<i>C. gattii</i>	FIOCRUZ Rio de Janeiro	70,5	3,74	3,0	165,5	329,5	98
CGF002	<i>C. gattii</i>	FIOCRUZ Rio de Janeiro	68,8	3,91	2,7	411,1	1864	117
CGF003	<i>C. gattii</i>	FIOCRUZ Rio de Janeiro	56,9	2,28	3,3	739,8	1990	100
CGF004	<i>C. gattii</i>	FIOCRUZ Rio de Janeiro	72,1	3,64	4,1	21,1	170	108
CGF005	<i>C. gattii</i>	FIOCRUZ Rio de Janeiro	63,3	2,92	1,9	814,5	2200	144
CGF006	<i>C. gattii</i>	FIOCRUZ Rio de Janeiro	76,5	3,54	4,6	834,6	1981	175

CGF007	<i>C. gattii</i>	FIOCRUZ Rio de Janeiro	73,3	2,82	4,5	973,7	1470	170
CGF008	<i>C. gattii</i>	FIOCRUZ Rio de Janeiro	62,1	3,65	2,8	80,2	444,5	89
CGF009	<i>C. gattii</i>	FIOCRUZ Rio de Janeiro	68,3	2,50	1,0	855,4	1969	125
CGF010	<i>C. gattii</i>	FIOCRUZ Rio de Janeiro	69,6	2,64	1,1	1063,1	1578	99
CGF011	<i>C. gattii</i>	FIOCRUZ Rio de Janeiro	68,6	2,52	2,6	883,1	1765	116
CGF012	<i>C. gattii</i>	FIOCRUZ Rio de Janeiro	79,1	4,08	3,0	1199,2	2316	133
CNB001	<i>C. neoformans</i>	LACEN Brasília	37,0	2,2	0,6	-	-	-
CNB002	<i>C. neoformans</i>	LACEN Brasília	56,9	1,1	0,6	-	-	-
CNB003. 1	<i>C. neoformans</i>	LACEN Brasília	21,6	1,5	0,7	-	-	-
CNB004. 1	<i>C. neoformans</i>	LACEN Brasília	37,1	1,2	0,2	-	-	-
CNB004. 2	<i>C. neoformans</i>	LACEN Brasília	29,8	2,7	0,1	-	-	-
CNB006	<i>C. neoformans</i>	LACEN Brasília	42,6	1,0	0,2	-	-	-
CNB007. 1	<i>C. neoformans</i>	LACEN Brasília	26,3	2,0	0,7	-	-	-
CNB008. 1	<i>C. neoformans</i>	LACEN Brasília	51,4	2,1	0,6	-	-	-
CNB007. 2	<i>C. neoformans</i>	LACEN Brasília	25,2	1,5	0,6	-	-	-
CNB010	<i>C. neoformans</i>	LACEN Brasília	42,3	1,5	1,1	-	-	-