



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS**

KAREN CRISTINI YUMI OGAWA FURTADO

**CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA, GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DA
CRIPTOCOCOSE EM UMA UNIDADE DE REFERÊNCIA NO ESTADO DO PARÁ.**

**BELÉM – PA
2012**

KAREN CRISTINI YUMI OGAWA FURTADO

**CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA, GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DA
CRIPTOCOCOSE EM UMA UNIDADE DE REFERÊNCIA NO ESTADO DO PARÁ.**

Dissertação de mestrado apresentado a banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Prof^a Dr^a Rita Catarina Medeiros Sousa

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Edna Aoba Ishikawa

**Dados Internacionais de Catalogação-na- Publicação (CIP) –
Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA, Belém-PA**

Furtado, Karen Cristini Yumi Ogawa.

Caracterização epidemiológica, genotípica e fenotípica da criptococose em uma unidade de referência no Estado do Pará / Karen Cristini Yumi Ogawa Furtado; orientadora, Rita Catarina Medeiros Sousa, co-orientadora, Edna Aoba Yassui Ishikawa. – 2012

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará. Núcleo de Medicina Tropical. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Belém, 2012.

1. Criptococose. 2. *Cryptococcus neoformans*. 3. *Cryptococcus gattii*. 4. Pará. I. Sousa, Rita Catarina Medeiros, orient. II. Ishikawa, Edna Aoba Yassui, co-orient. III. Título.

CDD: 22. ed. 616.969098115



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS**

KAREN CRISTINI YUMI OGAWA FURTADO

**CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA, GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DA
CRIPTOCOCOSE EM UMA UNIDADE DE REFERÊNCIA NO ESTADO DO PARÁ.**

Banca examinadora:

Prof., Dr Rita Catarina Medeiros Sousa/UFPA - Orientadora

Prof., Dr Edna Aoba Ishikawa /UFPA – Co-orientadora

Profa. Dra. Maisa Silva de Sousa/UFPA – membro titular

Profa. Dra. Hellen Thais Fuzii/UFPA – membro titular

Prof. Dr. Cezar Augusto Muniz Caldas– membro titular

Profa. Dra. Luiza Caricio Martins– Suplente

Dissertação defendida em: 20/11/12

**BELÉM – PA
2012**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as chances que Ele me proporcionou.

Aos meus pais, Sônia Ogawa e Ronaldo Furtado, que sempre acreditaram em mim e apoiaram minhas decisões, sendo os principais responsáveis por todas as minhas conquistas.

Aos meus irmãos e familiares que sempre estiveram lutando comigo.

Ao meu marido, Régis Piloni Maestri, a qual precisou de paciência para entender a minha ausência.

A minha maravilhosa orientadora e amiga, Dra Rita Catarina Medeiros, minha imensa gratidão pela paciência, por todas as oportunidades oferecidas, por todos os conhecimentos compartilhados e por todo o empenho fornecido.

A minha querida co-orientadora, Dra Edna Ishikawa, que me ajudou em todas as etapas do desenvolvimento desse trabalho, fornecendo ajuda em todas as minhas dificuldades.

A Dra Hellen Fuzii, por toda ajuda disponibilizada.

A Silvana do Laboratório de Microbiologia do HUJBB, por toda sua paciência em ensinar e me ajudando em todos os momentos.

As integrantes do grupo da criptococose, Cylia, Izabela, Roseana, Lúcia, Thaíssa, Sheila e Eliza por todos os momentos em que trabalhamos juntas, por toda ajuda fornecida e pela amizade.

Aos chefes do Laboratório de Análises Clínicas do HUJBB, Dilermano e Daniel por disponibilizar o espaço para o desenvolvimento do trabalho.

A toda equipe do Laboratório do HUJBB, Noemia, Franci, Mauro, Edineuza que sempre me deram suporte no desenvolvimento do trabalho

A todos os colegas do Laboratório de Biologia Molecular do NMT, Camila, Ildison, Jaqueline, Danilo, Samanta por todos os conhecimentos compartilhados.

A Dra Márcia Lazera e a Luciana Trilles, pela ajuda fornecida.

A toda equipe do serviço de micologia do IPEC/FIOCRUZ.

Ao Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará pelo ensino.

A FAPESPA pelo financiamento da pesquisa.

“A dimensão de uma conquista não se mede pelo volume da obra, mas pela dificuldade na sua concepção, pela grandeza do seu propósito e pelo conteúdo que carrega.”

Carlos Alberto Bentes de Sousa

LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
aids	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
bp	Pares de bases
°C	Graus Celsius
CGB	Canavanina-Glicina-Azul de bromotimol
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	de Desoxirribonucleosídeo(s) Trifosfato(s)
DOPA	3,4 –dihidroxifenilalanina
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético
Galxm	Galactoxilomanana
GXM	Glicuronoxilomanana
HAART	Terapia Antiretroviral (do inglês <i>Highly Active Antiretroviral Treatment</i>)
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HUJBB	Hospital Universitário João de Barros Barreto
IL-1	Interleucina-1
ITS transcrita	<i>Internal Transcribed Sequence</i> – Seqüência espaçadora interna
Kb	Kilobase
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
M	Molar
mM	Milimolar
mg	Miligrama
MAT	Mating type.
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
MP	Manoproteína

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase.
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polimorphism</i> – fragmentos de DNA gerados por enzima de restrição
RPM	Rotações por minuto
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SNC	Sistema Nervoso Central
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TARV	Terapia Antirretroviral
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
TE	Tris-EDTA
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral- α
U	Unidade
UV	Ultravioleta
var	variedade
μL	Microlitro
μm	Micrômetro.
5-FC	5-fluocitosina

RESUMO

A criptococose é uma infecção fúngica causada por uma levedura encapsulada do gênero *Cryptococcus* que afeta tanto humanos quanto animais, sendo considerada como uma infecção oportunista normalmente associada à imunodepressão. Trata-se de uma das infecções fúngicas humanas de significativa morbidade e mortalidade tanto em indivíduos imunocomprometidos quanto em imunocompetentes, e manifesta-se principalmente sob a forma de meningoencefalite. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização epidemiológica, genotípica e fenotípica da criptococose em uma unidade de referência no estado do Pará. A população alvo foi composta pelos pacientes atendidos no Hospital Universitário João de Barros Barreto/UFGPA, de janeiro de 2010 a dezembro de 2011 com diagnóstico de criptococose confirmado laboratorialmente. Os dados pessoais, clínicos e laboratoriais foram coletados a partir da revisão dos prontuários do arquivo médico do HUJBB e os isolados foram identificados e caracterizados morfológica e bioquimicamente. O tipo sexuado e o genótipo foram identificados através de PCR utilizando iniciadores específicos. No período de janeiro de 2010 a dezembro de 2011 foram identificados 59 casos de criptococose. A maioria dos pacientes eram homens (36/59, 61%), com idade entre 5 a 70 anos, média de 30,8 anos. A faixa etária que predominou foi de 34 a 43 anos (39% dos casos). Os principais sinais e sintomas apresentados por eles foram cefaleia (85,5%), vômito (80%) e febre (76,4%). Todas as crianças (6/6) eram HIV negativas, tendo como agente causador o *C. gattii* (31,6%); já em adultos 71,1% das infecções eram causadas por *C. neoformans*, sendo a maioria HIV positivo. Os casos de óbito e de recidivas foram mais elevados entre os pacientes infectados por *C. neoformans* e a presença de sequelas foi mais frequente entre os pacientes infectados por *C. gattii*. Todos os isolados eram MAT α e houve a predominância de dois tipos moleculares: VNI (64,4%) e VGII (35,6%). Este estudo reforça que o estado do Pará é endêmico para a infecção por *Cryptococcus spp.*, cuja forma de apresentação clínica principal, a meningoencefalite determina elevadas taxas de morbi-mortalidade.

Palavras-chave: Criptococose. *Cryptococcus neoformans*. *Cryptococcus gattii*.

ABSTRACT

Cryptococcosis is a fungal infection caused by an encapsulated yeast *Cryptococcus* genus that affects both humans and animals, and is considered as an opportunistic infection commonly associated with immunosuppression. This is one of human fungal infections cause significant morbidity and mortality in both immunocompetent and in immunocompromised individuals and appears mainly in the form of meningoencephalitis. The aim of this study was to characterize epidemiological, genotypic and phenotypic cryptococcosis in a reference unit in the state of Pará. The target population was composed of patients treated at the University Hospital João de Barros Barreto/UFPA, January 2010 to December 2011 with laboratory confirmed diagnosis of cryptococcosis. Personal, clinical and laboratory data were collected from a review of medical records file HUUJBB and the isolates were identified and characterized morphologically and biochemically. The type sexed and genotype were identified by PCR using specific primers. From January 2010 to December 2011 were identified 59 cases of cryptococcosis. Most patients were men (36/59, 61%), aged 5-70 years, mean 30.8 years. The predominant age group was 34-43 years (39% of cases). The main signs and symptoms presented by them were headache (85.5%), vomiting (80%) and fever (76.4%). All children (6/6) were HIV negative, and as the causative agent *C. gattii* (31.6%), while in adults 71.1% of infections were caused by *C. neoformans*, most HIV positive. The cases of death and recurrence were higher among patients infected with *C. neoformans* and the presence of sequelae was more frequent among patients infected with *C. gattii*. All isolates were MAT α and there was a predominance of two molecular types: VNI (64.4%) and VGII (35.6%). This study reinforces that the state of Pará is endemic to infection by *Cryptococcus* spp., Whose main clinical presentation, meningoencephalitis determines high rates of morbidity and mortality.

Keyword: Cryptococcosis. *Cryptococcus neoformans*. *Cryptococcus gattii*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Morfologia do <i>Cryptococcus</i> spp	19
Figura 2: Classificação taxonômica das espécies do complexo <i>Cryptococcus</i>	20
Figura 3: Ciclo de infecção do <i>Cryptococcus</i>	28
Figura 4: Interação do <i>Cryptococcus</i> com as células fagocíticas e a disseminação através da barreira hematoencefálica	30
Figura 5: Modelo do ciclo reprodutivo do <i>Cryptococcus</i> spp	31
Figura 6: Esquema de infecção dos macrófagos pelo <i>Cryptococcus</i>	33
Figura 7: Mecanismo proposto para a produção de melanina pelas cepas patogênicas de <i>Cryptococcus</i>	35
Figura 8: Cultivo de <i>Cryptococcus</i> em Agar Sabouraud Dextrose	40
Figura 9: Meio de cultura CGB evidenciando a diferença entre <i>C. neoformans</i> (amarelo) e <i>C. gattii</i> (azul)	40
Figura 10: Gel de agarose demonstrando os tipos sexuais através dos iniciadores para MAT a e MAT α de seis isolados ambientais.	49
Figura 11: Perfil do PCR para o gene URA5.....	51
Figura 12: Gel de agarose ilustrando os tipos moleculares obtidos por PCR/RFLP	51
Figura 13: Distribuição dos casos de criptococose por mesorregiões do Pará	55
Figura 14: Gel de agarose evidenciando produto de PCR para tipo sexual de <i>Cryptococcus</i> spp.....	63
Figura 15: Gel de agarose evidenciando produto de PCR utilizando a técnica de RFLP duplamente digerido com <i>Sau96I</i> e <i>HhaI</i>	64
Figura 16: Gel de agarose evidenciando os tipos moleculares do <i>Cryptococcus</i> spp. através da técnica de PCR <i>fingerprint</i> (M13).....	65

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. JUSTIFICATIVA	15
3. OBJETIVOS	16
3.1 OBJETIVO GERAL	16
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
4. REFERENCIAL TEÓRICO	17
4.1 HISTÓRICO	17
4.2 LEVEDURAS DO GÊNERO <i>CRYPTOCOCCUS</i>	19
4.2.1 Características Morfológicas	19
4.2.2 Epidemiologia	20
4.2.3 Sorotipos	21
4.2.4 Tipos Moleculares	24
4.2.5 <i>Cryptococcus neoformans</i>	25
4.2.6 <i>Cryptococcus gattii</i>	26
4.3 CICLO DE INFECÇÃO.....	28
4.4 CICLO REPRODUTIVO.....	30
4.5 FATORES DE VIRULÊNCIA.....	32
4.5.1 Cápsula	32
4.5.2 Produção de melanina	34
4.5.3 Urease	36
4.5.4 Fosfolipase	37
4.5.5 Crescimento a 37°C	37
4.5.6 Tipos Sexuados	37
4.6 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	38
4.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	38
4.7.1 Microscopia	39
4.7.2 Cultivo	39
4.7.3 Diagnóstico Imunológico	41
4.8 TRATAMENTO	41
5. MATERIAL E MÉTODOS	46

5.1 TIPO DE ESTUDO	46
5.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA DE ESTUDO	46
5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	46
5.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	46
5.5 COLETA DE DADOS	47
5.6 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA	47
5.7 EXTRAÇÃO DE DNA.....	48
5.8 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO TIPO SEXUADO	48
5.9 TIPAGEM MOLECULAR.....	50
5.10 ANÁLISE DE SIMILARIDADE	52
5.11 FINANCIAMENTO DO PROJETO	52
5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
6. ASPECTOS ÉTICOS	53
7. RESULTADOS.....	54
8. DISCUSSÃO	66
9. CONCLUSÃO	72
10. PERSPECTIVAS.....	73
REFERÊNCIAS.....	74

1 INTRODUÇÃO

A criptococose é uma infecção fúngica causada por uma levedura encapsulada do gênero *Cryptococcus* que afeta tanto humanos quanto animais (ALVARADO-RAMÍREZ et al., 2008). Ela é considerada uma infecção oportunista, pois geralmente está associada à imunodepressão. Considerando sua forma de apresentação mais frequente, a meningoencefalite, a criptococose está entre as infecções fúngicas humanas de significativa morbimortalidade tanto em indivíduos imunocomprometidos quanto em imunocompetentes (BUTLER et al., 1964; CHUCK & SANDE, 1989; KOVACS et al., 1985; LIFSON et al., 2006; LINDENBERG et al., 2008; MITCHELL & PERFECT, 1995; ROZENBAUM & GONÇALVES, 1994).

Essa doença pode ser causada por duas espécies distintas: *Cryptococcus neoformans* e o *Cryptococcus gattii*, que diferem tanto do ponto de vista clínico quanto epidemiológico (CASADEVALL & PERFECT, 1998). De fato, o *C. neoformans* é cosmopolita e, em geral, sua infecção em humanos está associada a condições de imunodepressão celular. O *C. gattii*, ao contrário, é endêmico em áreas tropicais e subtropicais e mais comumente relatado como um patógeno primário em pacientes imunocompetentes (KON et al., 2008; TOMÁS, 2002).

Durante muito tempo, o *Cryptococcus spp.* foi um fungo pouco estudado já que a criptococose era uma doença rara. Essa situação foi alterada com o aparecimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (aids) e com a utilização de drogas imunossupressoras, que contribuíram drasticamente para o aumento mundial do número de casos de criptococose (CASADEVALL & PERFECT, 1998; DRUMMOND et al., 2007; FRIEDMAN et al., 2005; IDNURM et al., 2005; KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; LEVITZ & BOEKHOUT, 2006).

A infecção causada pelo *C. gattii* apresenta diferenças nas manifestações clínicas como a presença significativa de massas inflamatórias (criptococomas) que podem produzir sequelas neurológicas (CHEN et al., 2000; SPEED & DUNT, 1995). Além disso, a infecção causada por essa espécie requer uma maior dose de anfotericina B, um tratamento mais prolongado e com frequência exige procedimentos cirúrgicos para evitar recidivas ou corrigir sequelas (SEVERO et al., 2009).

Estudos epidemiológicos realizados no Brasil têm demonstrado que as regiões Norte e Nordeste apresentam um elevado número de casos de criptococose causada pelo *C. gattii*, principalmente entre crianças e adultos jovens (CAVALCANTI, 1997; CORREA et al., 1999; MARTINS, 2003). No estado do Pará, entre 1992 e 1999, 78 pacientes foram diagnosticados com criptococose, dentre os quais 19 eram crianças menores de 13 anos, aparentemente imunocompetentes, todas com doença fúngica envolvendo o Sistema Nervoso Central (SNC). No estudo que descreve esses casos, relata-se que apenas em 9 (47%), foi estabelecido que o agente causador da infecção era *C. gattii*, sugerindo que o Pará seria uma importante região endêmica da criptococose pelo *C. gattii* (CORREA et al., 1999).

Apesar dos casos de criptococose no estado do Pará serem constantemente diagnosticados e registrados no Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB), poucos são os dados publicados em revistas científicas. Por isso, o conhecimento e a divulgação das características moleculares, epidemiológicas e clínicas dos isolados de *Cryptococcus spp.* são importantes para melhor entendimento da criptococose no estado do Pará.

2 JUSTIFICATIVA

A incidência de doenças causadas por fungos patogênicos e oportunistas tem aumentado nas últimas décadas. Esse aumento ocorreu principalmente em decorrência da epidemia da aids. A criptococose é uma das mais freqüentes infecções oportunistas em pacientes com aids, sendo responsável por significativa morbidade e mortalidade nesses pacientes (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; RIBEIRO et al., 2009).

A criptococose no estado do Pará é uma endemia grave que ocorre em diferentes mesorregiões do estado e na área metropolitana de Belém. Diferente de outros locais do mundo, as regiões Norte e Nordeste vêm demonstrando elevadas taxas de morbidade e mortalidade em adolescentes e crianças sob a forma de meningoencefalite causada pelo *Cryptococcus gattii*, tipo molecular VGII, considerado o genótipo mais virulento dentre os agentes da criptococose. Esse agente acomete principalmente pacientes HIV negativos e sem evidência de fator predisponente. Comporta-se como micose sistêmica primária, causando meningoencefalite, com elevada letalidade. Além disso, são observadas sequelas incapacitantes acima de 80% nos sobreviventes, especialmente perda visual e auditiva, hidrocefalia, entre outras (CORREA et al., 1999; COSTA, 2008; SANTOS, 2008).

A criptococose associada a aids também ocorre na região Norte, representando cerca de 50% dos casos de meningoencefalite criptocócica registrada no Hospital Universitário João de Barros Barreto. Tem como principal agente o *C. neoformans* tipo molecular VNI, similar ao perfil observado mundialmente (SANTOS, 2008).

Até o momento, raros estudos sobre a criptococose foram desenvolvidos na região Norte, principalmente no que diz respeito a sorotipos, genótipos e perfil dos tipos sexuados dos isolados de *Cryptococcus spp.* Sendo assim, esse estudo visa realizar a caracterização epidemiológica, fenotípica e genotípica dos isolados de *Cryptococcus spp.* diagnosticados no HUIBB, correlacionando os perfis clínicos e epidemiológicos com os diversos fenótipos e genótipos desses agentes. Os resultados obtidos permitirão um melhor conhecimento da criptococose no estado do Pará.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização epidemiológica, genotípica e fenotípica da criptococose em uma unidade de referência no estado do Pará.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as características clínicas e epidemiológicas da criptococose;
- Caracterizar os fenótipos dos isolados, considerando espécie e tipo sexuado;
- Investigar a correlação entre os perfis clínicos e epidemiológicos com as duas espécies do fungo.
- Identificar os tipos moleculares dos isolados relacionados aos casos estudados;

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 HISTÓRICO

Em 1894, dois médicos alemães, Otto Busse e Abraham Buschke, descreveram o primeiro caso de criptococose humana em uma mulher de 31 anos que apresentava uma lesão na tíbia. Busse observou a presença de corpúsculos redondos nessa lesão e isolou um microorganismo que denominou de *Saccharomyces hominis*. Neste mesmo ano, Sanfelice isolou uma levedura encapsulada de suco de pêssigo em fermentação e demonstrou que se tratava de um microorganismo patogênico em animais de laboratório, denominando-o de *Saccharomyces neoformans* (BARNETT, 2010; CASADEVALL & PERFECT, 1998).

Em 1896 foi descrito o segundo caso de criptococose, dessa vez na França por Curtis, que recuperou um fungo, semelhante a uma levedura, de uma lesão de quadril e denominou-o de *Saccharomyces subcutaneous tumefaciens*.

Em 1931, Freeman sugeriu que a primeira descrição de criptococose tinha sido feita por Zenker em 1861. Mesmo sem a realização de uma cultura para acompanhar o caso de Zenker, Freeman argumentava que a descrição clínica e patológica desse caso se tratava de meningite criptocócica. Essa sugestão poderia até ser verdade, mas o mérito da descoberta do *Cryptococcus neoformans* e a descrição da doença foram dados a Busse e Buschke. Na primeira metade do século 20, ocorreu a consolidação do *C. neoformans* como um patógeno, onde foram relatadas infecções criptocócicas em diversos órgãos como cérebro, pulmões e pele (CASADEVALL & PERFECT, 1998).

Em 1901, Jean Paul Vuillemin da Universidade de Nancy na França realizou um estudo com esta levedura e não encontrou os típicos ascósporos do gênero *Saccharomyces* e observou que elas não fermentavam carboidrato, classificando-as, então, no gênero *Cryptococcus* (VUILLEMIN, apud TOMÁS, 2002).

O primeiro relato de meningite criptocócica foi feito em 1905 por Von Hansemann, que descreveu a doença como tuberculose com cistos gelatinosos (HANSEMANN, 1905). Em 1916, Stoddard e Cutler descreveram dois casos de infecção criptocócica e chamou o microorganismo de *Torula histolytica* ao fazer uma interpretação equivocada do espaço ao redor da cápsula em tecidos como a lise de células hospedeiras. Eles podem ter-se enganado ao acreditar que haviam

identificado um microorganismo diferente daquele de Busse e Buschke, achando que seu organismo formava ascósporos (CASADEVALL & PERFECT, 1998). Em 1950, Benham sugeriu a modificação do termo torulose para criptococose e *Cryptococcus neoformans* como *nomen conservandum* (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992). A descrição da patologia e dos aspectos da criptococose pulmonar primária foram descritos por Baker e Haugen em 1955 (BAKER & HAUGEN, 1955). Nesse mesmo ano, Emmons documentou pela primeira vez a fonte de infecção, quando isolou cepas de *C. neoformans* a partir de fezes de pombos (EMMONS, 1955). Em 1962, Staib possibilitou o desenvolvimento de um meio seletivo para *C. neoformans* ao observar que ele formava colônias marrons quando cultivado em um meio contendo semente de níger (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992).

Em 1989, foi descrita uma variedade distinta de *C. neoformans*, denominada de *C. neoformans* var. *gattii* obtida a partir de um isolado de líquido de um menino na África Central (DE VROEY & GATTI, 1989). Pouco depois, em 1990, Ellis e Pfeiffer sugeriram que o nicho ecológico do *C. gattii* estava relacionado com algumas espécies de eucaliptos como *Eucalyptus camaldulensis*, onde a dispersão desse microorganismo parece ocorrer no fim da primavera, concomitantemente com o florescimento de *E. camaldulensis* (ELLIS & PFEIFFER, 1990a).

Através da análise de sequências do gene URA5 e padrões de DNA *fingerprint*, Franzot et al. (1999) descreveram uma nova variedade para os isolados de sorotipo A, denominada de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, devido a significativas diferenças genéticas entre os sorotipos A e D.

Diferentes genes (URA5, CNLAC1, CAP59, CAP64, IGS e ITS rRNA, mtLrRNA) de *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii* foram analisados e, independente do marcador utilizado, a variedade *gattii* apresentou-se como um grupo monofilético distinto e divergente da variedade *neoformans* (KATSU et al., 2004). Com isso, atualmente são reconhecidas duas espécies do complexo *Cryptococcus neoformans*: *Cryptococcus neoformans* (*Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*) e *Cryptococcus gattii* (*Cryptococcus neoformans* var. *gattii*).

4.2 LEVEDURAS DO GÊNERO *CRYPTOCOCCUS*

4.2.1 Características morfológicas

São leveduras esféricas ou ovais, com diâmetro de 4 a 10 μm que normalmente apresentam um único brotamento (CASADEVALL & PERFECT, 1998; MITCHELL & PERFECT, 1995). Algumas cepas pouco encapsuladas podem apresentar um diâmetro de apenas 2 a 5 μm , enquanto que cepas fortemente encapsuladas, retiradas de tecidos infectados, podem apresentar um tamanho superior a 80 μm . Além da forma de levedura, pseudohifas também podem ser ocasionalmente produzidas e observadas em cortes histológicos (CASADEVALL & PERFECT, 1998). Através de extensivos estudos por microscopia eletrônica foi possível demonstrar que as células do *Cryptococcus neoformans* apresentam aspectos morfológicos típicos de células eucariotas (Figura 1 A e B). Elas possuem um único núcleo, com um nucléolo, coberto por uma dupla membrana e dimensão de aproximadamente 1,5 por 1,2 μm . O citoplasma apresenta diversas organelas como mitocôndrias, vacúolos, retículo endoplasmático e ribossomos. Além disso, a microscopia eletrônica também revelou que a cápsula é composta por uma rede de microfibrilas (CASADEVALL & PERFECT, 1998).

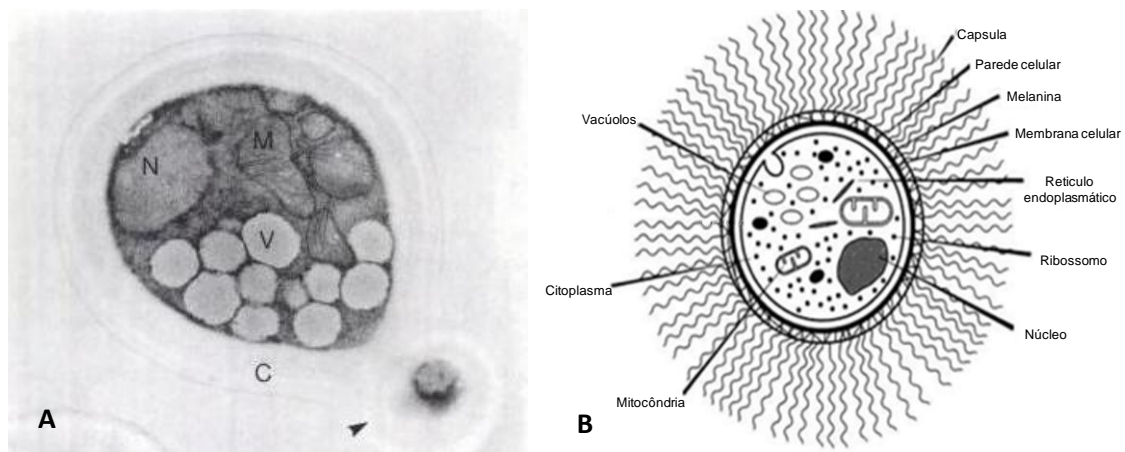


Figura 1: Morfologia do *Cryptococcus* spp. (A) Micrografia eletrônica de transmissão do *Cryptococcus neoformans*. (B) Diagrama do *Cryptococcus neoformans* baseado em microscopia eletrônica.

Fonte: Adaptado de Casadevall & Perfect, 1998.

4.2.2 Epidemiologia

A criptococose era uma doença esporadicamente relatada tornando-se mais comum no final de 1970 (CASADEVALL & PERFECT, 1998). A partir de 1981, o número de casos de criptococose aumentou drasticamente em alguns países em decorrência da epidemia de aids e posteriormente reduzindo com o aumento do uso de fluconazol e com a introdução da HAART em 1996 (BICANIC & HARRISON, 2005). Mirza et al. (2003) realizaram um estudo no período de 1992-2000 em duas áreas dos Estados Unidos, onde a ocorrência anual de criptococose por 1000 pacientes com aids teve uma redução significativa em ambas as áreas. Em Atlanta foi observada um decréscimo de 66 em 1992 para 7 casos em 2000 e em Houston de 24 em 1993 para 2 casos em 2000. Dromer et al. (2004) demonstraram uma redução de 46% da incidência de criptococose na França após a introdução da terapia antiretroviral (292 casos, 1997-2001) comparado aos anos anteriores (1352 casos, 1985-1996).

A criptococose tem sido reportada em diversas partes do mundo, como Europa, Ásia e África (CHARIYALERTSAK et al., 2001; FRENCH et al., 2002; VIVIANI et al., 2006). Na Espanha, foram observados 58 casos de criptococose de 1998 a 1999, onde foi observada maior incidência em adultos com idade entre 30 a 40 anos (48,8%) e pacientes infectados pelo HIV (86%) (COLOM et al., 2001). Na Europa, Viviani et al. (2006) avaliou 565 casos de criptococose, onde 77% deles estavam associados ao HIV. A maior parte dos pacientes eram homens com idade entre 9 a 83 anos, destes 45 % tinha entre 31 a 40 anos.

Na América do Sul, Bava et al. (1997) realizaram um estudo retrospectivo na Argentina no período de 1981 a 1993 com 253 casos de criptococose. A maior parte da população de estudo eram homens com idade entre 20 a 39 anos.

No Brasil, estima-se que a prevalência de criptococose associada a aids esteja entre 8 e 12% em centros de referência, ocorrendo como a primeira manifestação oportunista em 4,4% dos casos de aids (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000). Diferente do que se observa em outras regiões do Brasil e do mundo, nas regiões Norte e Nordeste do Brasil há uma elevada ocorrência de casos de criptococose em indivíduos aparentemente imunocompetentes de ambos os sexos, HIV negativo, tendo como agente causador o *C. gattii*. Essa espécie é endêmica

nestas regiões ocorrendo principalmente sob a forma de meningoencefalite com elevada morbidade e letalidade (SANTOS, 2008).

4.2.3 Sorotipos

A natureza polissacarídica da cápsula do fungo, constituída principalmente por glucuronoxilomanana (GXM), permite a determinação de 5 sorotipos: A, B, C, D e AD (KON et al., 2008). O *C. neoformans* apresenta 3 sorotipos, nos quais são reconhecidas duas variedades: sorotipo D (*Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*), sorotipo A (*Cryptococcus neoformans* var. *grubii*) e o sorotipo AD (híbrido) (Figura 2). Já o *C. gattii* divide-se em sorotipos B e C (BOEKHOUT et al., 2001; FRANZOT et al., 1999).

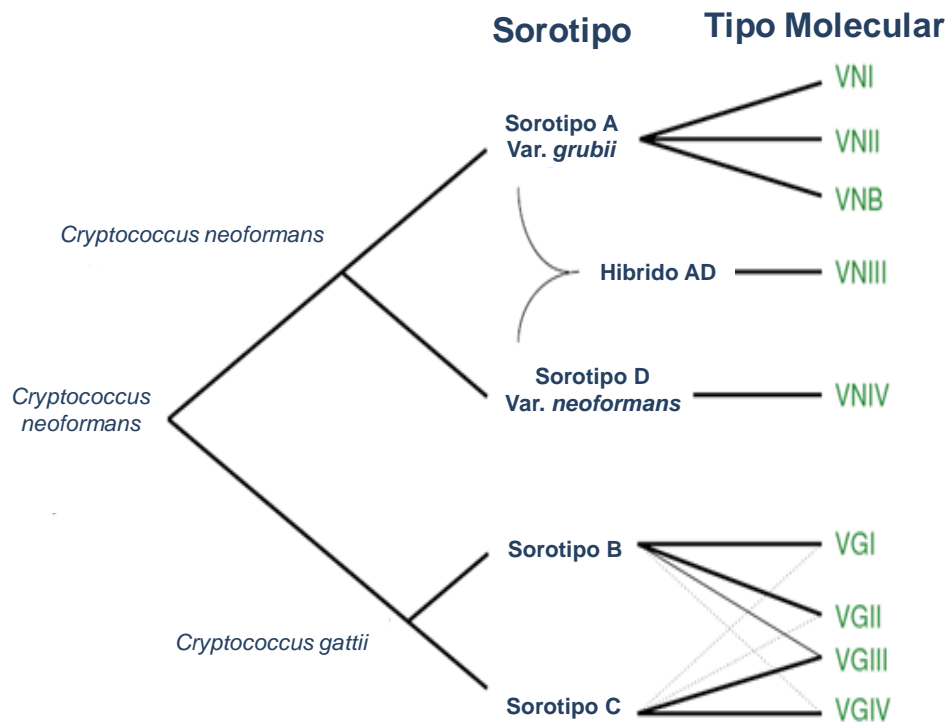


Figura 2: Classificação taxonômica das espécies do complexo *Cryptococcus*.

Fonte: Adaptado de Lin & Heitman, 2006.

Em 1999, foi proposta a separação do sorotipo A em uma variedade diferente, chamada de *C. neoformans* var. *grubii*, através de análises das sequências do gene URA5 e padrões de DNA *fingerprinting* (FRANZOT et al. 1999). Esse sorotipo ocorre

essencialmente em hospedeiros imunocomprometidos, apresenta um caráter cosmopolita e corresponde a 95% dos isolados clínicos de *C. neoformans* (HULL & HEITMAN, 2002). Além disso, o sorotipo A apresenta uma ampla disseminação em ambientes urbanos e está relacionado a fezes de pombos e madeira em decomposição (NISHIKAWA et al., 2003).

Anteriormente, o *C. gattii* era considerado uma variedade de *C. neoformans* (sorotipos C e D), mas devido às diferenças nas linhagens monofiléticas encontradas em estudos moleculares, eles foram separados em duas espécies distintas (KWON-CHUNG et al., 2002; KWON-CHUNG & VARMA, 2006).

A distribuição geográfica dos isolados de *C. neoformans* dos sorotipos A e D é diferente tanto para amostras clínicas quanto para ambientais (BENNETT et al., 1977). Segundo Martinez et al. (2001), as cepas de *C. neoformans* do sorotipo D são mais susceptíveis a morte por elevadas temperaturas do que as cepas do sorotipo A, explicando a alta prevalência do sorotipo D nos países do norte europeu que apresentam um clima temperado, como Dinamarca, Itália (TORTORANO et al., 1997), Suíça (KWON-CHUNG & BENNETT, 1984), França (DROMER et al., 1996), Alemanha, Áustria (TINTELNOT et al., 2001; 2004) e Espanha (BARÓ et al., 1999). Essa tolerância térmica dos isolados de sorotipo A pode conferir uma maior sobrevivência em climas mais quentes.

As manifestações clínicas observadas em infecções humanas causadas pelos sorotipos A e D são aparentemente semelhantes, diferente do que foi observado em infecções experimentais que demonstraram que as cepas do sorotipo A são mais virulentas do que as do sorotipo D (CASADEVALL & PERFECT, 1998; LIN & HEITMAN, 2006).

O sorotipo AD é um híbrido de duas variedades, resultando da fusão de cepas do sorotipo A com o sorotipo D. Enquanto que a maioria dos isolados de sorotipo A e D são haplóides, as cepas AD são diplóides ou aneuplóides possuindo 2 alelos para o tipo sexuado (LENGELER et al., 2001).

O sorotipo B (de *C. gattii*) normalmente é encontrado em regiões tropicais e subtropicais em indivíduos aparentemente imunocompetentes. Esse sorotipo já foi isolado de *Eucaplyptus camaldulensis* na Itália, Índia, Brasil e Austrália (CHAKRABARTI et al., 1997; ELLIS & PFEIFFER, 1990; PASSONI, 1999).

Os isolados do sorotipo C são extremamente raros e pouco se sabe sobre sua epidemiologia e fisiologia. A maioria dos isolados clínicos desse sorotipo foram

obtidos de pacientes imunocompetentes no sul da Califórnia (KWON-CHUNG & BENNETT, 1984). Outros estudos também relataram o isolamento do sorotipo C na Tailândia (SUKROONGREUNG et al., 1996), Brasil (NISHIKAWA et al., 2003), Colômbia (CALLEJAS et al., 1998), África Subsaariana (LITVINTSEVA et al., 2005), Canadá e Estados Unidos (KWON-CHUNG & BENNETT, 1984).

Na Espanha, um estudo com 43 casos mostrou que a ocorrência de criptococose foi de 88,4% em homens e de 11,6% em mulheres. Dentre os casos analisados, 37 (86%) eram infectados pelo HIV, 3 (7%) possuíam outros fatores de risco como leucemia mieloide aguda e diabetes e em 3 (7%) pacientes não foi possível definir um fator predisponente. Todos os isolados corresponderam a *C. neoformans*, sendo 45,5% do sorotipo A, 22,7% do sorotipo D e 22,7% do sorotipo AD (COLOM et al., 2001).

Já na Colômbia foram analisados 370 isolados clínicos, dentre eles 95,2% (352) correspondiam ao *C. neoformans* e 4,8% (18) dos casos se tratava de *C. gattii*. Com relação aos sorotipos, 351 eram do sorotipo A, 1 do sorotipo D, 17 do sorotipo B e 1 do sorotipo C (ORDÓÑEZ & CASTAÑEDA, 2001).

Um estudo realizado na Venezuela analisou 132 isolados clínicos e identificou que 120 eram *C. neoformans* e 12 eram *C. gatti*. Além de determinar a espécie, também foram identificados os sorotipos desses isolados onde 59,8% foram tipados como sorotipo A, seguido de 25,8% do sorotipo D, 5,3% do sorotipo AD, 5,3% do sorotipo C e 3,8% do sorotipo B (PÉREZ et al., 2008).

Na Índia, 87% dos isolados pertenciam ao sorotipo A e 11% ao sorotipo B. Nesse mesmo estudo foi relatado o caso de um paciente imunocompetente em que foram isolados dois sorotipos, A e B, simultaneamente de dois locais diferentes: pulmão e abscesso do couro cabeludo. Este foi o primeiro relato de caso em que uma pessoa era infectada por dois sorotipos diferentes ao mesmo tempo (BANERJEE et al., 2004).

Nishikawa et al. (2003) realizaram a sorotipagem de 467 isolados clínicos e ambientais de diversas regiões do Brasil. A sorotipagem dos isolados clínicos mostrou a prevalência do sorotipo A (77,95%), seguido pelo B (18,2%), AD (1,3%), D (0,4%), C (0,2%) e não tipável (1,93%). Nesse estudo foi observado que nas regiões Sul e Sudeste prevaleceram o sorotipo A, reproduzindo um quadro observado mundialmente. Já na região Nordeste prevaleceu o sorotipo B, ocorrendo igualmente em homens e mulheres.

4.2.4 Tipos Moleculares

As diferenças genéticas entre as espécies de *Cryptococcus* têm sido observadas através de métodos de biologia molecular como RFLP (*Restriction Fragment Length Polimorphism*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorfism*) e PCR *fingerprint*. Essas técnicas constituem uma importante ferramenta para o estudo da epidemiologia molecular dos isolados de *Cryptococcus* spp (MEYER et al., 1999; 2003).

A PCR *fingerprint* é uma técnica de tipagem que tem sido muito utilizada para análise molecular do *Cryptococcus* spp. Essa técnica combina a especificidade da clássica DNA *fingerprint* por hibridização com a rapidez e a simplicidade da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Iniciadores específicos individuais para DNA minissatélite e para sequências de DNA repetitivo são usados para amplificar polimorfismos no DNA do genoma de *Cryptococcus* utilizando DNA de alto peso molecular como padrão de PCR. Essa técnica utiliza oligonucleotídeos específicos para minissatélites (M13) e microssatélites (GACA)₄ amplificando sequências de DNA repetitivas hipervariáveis de *Cryptococcus* spp.(MEYER et al., 1993). Essa PCR gera produtos que variam de 500 a 2500 bp em tamanho e permite agrupar os isolados em oito padrões moleculares principais: VNI e VNII (sorotipo A), VNIII (sorotipo AD), VNIV (sorotipo D), VGI, VGII, VGIII, VGIV (sorotipo B e C) (FRASER et al., 2005; MEYER et al., 1999). Ainda não existe uma correlação entre os tipos moleculares e os sorotipos de *C. gattii* (MEYER et al., 2003).

Um estudo realizado com a participação de laboratórios do Grupo de Estudo Criptocócico Iberoamericano reuniu amostras de nove países como o Brasil e o Chile. Este estudo analisou 340 isolados de *Cryptococcus*, sendo 266 isolados clínicos, 7 de origem veterinária e 67 ambientais e submeteu-os a tipagem molecular, dos quais 73,8% (n=251) eram *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, 1,8% (n=6) *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, 4,1% (n=14) eram isolados AD híbridos e 20,3% (n=69) eram *Cryptococcus gattii*. Após a tipagem molecular observou-se que 232 (68,2%) eram do tipo molecular VNI (sorotipo A, var. *grubii*), 19 (5,6%) eram do tipo molecular VNII (sorotipo A, var. *grubii*), 14 (4,1%) eram do tipo molecular VNIII (sorotipo AD, híbrido entre os sorotipos A e D), 6 (1,8%) eram do tipo molecular VNIV (sorotipo D, var. *neoformans*), 12 (3,5%) eram do tipo molecular VGI (sorotipo B e C, var. *gattii*), 21 (6,2%) eram do tipo molecular VGII (sorotipo B e C, var. *gattii*),

31 (9,1%) eram do tipo molecular VGIII (sorotipo B e C, var. *gattii*) e 5 (1,5%) eram do tipo molecular VGIV (sorotipo B e C, var. *gattii*). Além disso, dos 266 isolados clínicos, 177 eram de pacientes HIV positivos nos quais a maioria era dos tipos moleculares VNI e VNII, representando o *C. neoformans* var. *grubii* (MEYER et al., 2003).

No estudo citado acima, o tipo molecular VGIII foi predominante entre os isolados de *C. gattii* na Argentina, Colômbia e México, diferente de estudos anteriores que mostravam que esse tipo molecular era geograficamente restrito a Índia e aos Estados Unidos (MEYER et al., 2003).

Os tipos moleculares VNI e VGI são os que predominam no mundo como agentes da criptococose, mas na América Latina a distribuição e ocorrência de tipos moleculares de *C. gattii* é diferente dos demais continentes (BOEKHOUT et al., 2001; MEYER et al., 2003; TRILLES et al., 2003). Nas regiões Norte e Nordeste há o predomínio do tipo molecular VGII causando meningite criptocócica principalmente em pacientes imunocompetentes. Enquanto que nas regiões sul e sudeste, o tipo molecular predominante é o VNI, acometendo, principalmente, pacientes imunocomprometidos (IGREJA et al., 2004; MATSUMOTO et al., 2007; SANTOS, 2008; TRILLES et al., 2008).

4.2.5 *Cryptococcus neoformans*

A espécie *C. neoformans* pode ser encontrada mundialmente e tende a infectar principalmente, mas não exclusivamente, pacientes imunodeprimidos com aids (CHEN et al., 2008). A doença criptocócica também pode ser favorecida, em menor frequência, por outras formas de imunodepressão como o uso prolongado de corticóides, lúpus eritematoso sistêmico e outras doenças autoimunes, diabetes, tuberculose, cirrose hepática, alcoolismo, gravidez, transplante de órgãos sólidos, linfomas, câncer, sarcoidose e uso de drogas imunossupressoras utilizadas nestas condições (CAMERON et al., 1991; CHRISTOPH, 1990; KERKERING et al., 1981). Antes do uso da terapia antirretroviral de alta potência, a chamada HAART, a incidência da criptococose em pacientes com aids era estimada em 6 a 10% nos EUA, Europa Ocidental e Austrália e de 15 a 30% na África Sub-Saariana (POWDERLY, 1993).

O *C. neoformans* é frequentemente associado à excretas secas de pombos ou solos contaminados com fezes de aves, que são ricas em uréia e creatinina, favorecendo o crescimento abundante dessa levedura (GRANADOS & CASTAÑEDA, 2005; FARIA et al., 2010; FILIÚ et al., 2002; KWON-CHUNG & BENNETT, 1984). Essa espécie também pode ser isolada de poeira doméstica, constituindo uma importante fonte de infecção para moradores de centros urbanos (COSTA, 2008; DELGADO, 2005; SWINNE et al., 1989; SWINNE et al., 1994). Além disso, ele também pode ser encontrado em madeira em decomposição proveniente de áreas tropicais de diversas regiões do Brasil (LAZÉRA et al., 1993; 1996; 2000; RESTREPO et al., 2000).

Passoni et al. (1998) realizaram um estudo na região metropolitana do Rio de Janeiro de onde foram coletadas 824 amostras de 154 habitações. O *C. neoformans* foi isolado em 20 (13%) habitações e o principal fator associado com a contaminação domiciliar por esse fungo foi a presença de aves no ambiente doméstico ou nas proximidades da casa.

Alguns métodos moleculares têm contribuído para mostrar que o *C. neoformans* pode ser dividido em duas variedades chamadas de var. *grubii* (sorotipo A) e var. *neoformans* (sorotipo D) (FRANZOT et al., 1999). O *C. neoformans* var. *grubii* já foi isolado de amostras de *Eucalyptus* em regiões de solo alcalino (ERGIN et al., 2004) e em espécies de árvores utilizadas para decorar a gaiola dos animais em um zoológico da Antuérpia (BAUWENS et al., 2004). Além disso, estudos demonstraram que as cepas dessa variedade, correspondente ao sorotipo A, são as mais isoladas de pacientes com criptococose no Brasil (CASALI et al., 2003; IGREJA et al., 2004; SOUZA et al., 2009).

4.2.6 *Cryptococcus gattii*

O *Cryptococcus gattii* é a espécie que mais causa infecção em indivíduos imunocompetentes. Ocorre esporadicamente e está distribuído preferencialmente em áreas tropicais e subtropicais, podendo também ser encontrado em áreas de clima temperado e frio (CORRÊA et al., 2002; ELLIS, 1987; GROSSE et al., 2001; KIDD et al., 2007; KWON-CHUNG & BENNETT, 1984; LÓPEZ-MARTÍNEZ et al., 1996; SEATON et al., 1997; SORRELL, 2001; STEPHEN et al., 2002;

VELEGRAKI et al., 2001; VILCINS et al., 2002). Cepas de *C. gattii* isoladas de pacientes com aids são raramente relatadas (BODASING et al., 2004; SEVERO et al., 1999). No Brasil, o primeiro caso relatado dessa espécie em indivíduo com aids ocorreu em 1990 (ROZENBAUM et al., 1990).

O habitat natural dessa espécie foi inicialmente associado a restos de vegetais de *Eucalyptus camaldulensis* na Austrália e, posteriormente, isolado em diversas partes do mundo como Brasil, Colômbia, Camboja, Califórnia, Itália, Havaí, México, Paraguai, Tailândia, Vietnã, Nepal, Índia e países da África Central (CHAKRABARTI et al., 1997; COGLIATI et al., 2011; ELLIS & PFEIFFER, 1990a; ESCANDÓN et al., 2005; MONTAGNA et al., 1997; PADHYE et al., 1993; PFEIFFER & ELLIS, 1991). Atualmente, já se sabe que os eucaliptos não representam o habitat natural específico e nem estão associados especificamente ao *C. gattii*.

Apesar do *C. gattii* estar associado a espécies de *Eucalyptus*, Lazéra et al. (1998) isolaram repetidamente esta espécie de oco de árvores da espécie *Moquilea tomentosa*, apontando a ocorrência natural de *C. gattii* em madeira em decomposição de cavidades em árvores vivas.

Na Austrália, o *C. gattii* é amplamente endêmico e pode chegar a 95,5% dos isolados de *Cryptococcus* no território Norte e de 20 a 33 % na região sul (ELLIS, 1987; FISHER et al., 1993). Já no Brasil, o *C. gattii* é endêmico nas regiões Norte e Nordeste, podendo ser o agente isolado em 71% dos casos de criptococose na região Nordeste (CAVALCANTI, 1995). De 1992 a 1998, foram internados 78 pacientes com criptococose em um hospital universitário de Belém, destes pacientes, 19 eram crianças e apresentavam sinais e sintomas de infecção envolvendo o SNC. Das 19 amostras isoladas de crianças, 9 foram submetidas ao cultivo em meio CGB (canavanina-glicina-azul de bromotimol), e todas foram identificadas como *C. gattii* (CORRÊA et al., 1999). Estes estudos mostraram não somente que o *C. gattii* é um importante agente na criptococose em crianças, mas também que a doença está associada à alta taxa de mortalidade (35 a 40%) no Norte e Nordeste do Brasil.

4.3 CICLO DE INFECÇÃO

Apesar da forma clínica mais comum da infecção pelo *Cryptococcus* em humanos ser a meningite, a infecção se inicia pela inalação de basidiósporos ou leveduras desidratadas, prováveis propágulos infectantes resistentes às condições ambientais (KON et al., 2008; ELLIS & PFEIFFER, 1990b; GILES et al., 2009; LIN & HEITMAN, 2006; VELAGAPUDI et al., 2009). Estes propágulos são depositados nos alvéolos pulmonares e se disseminam pela via hematogênica para outras regiões do corpo, como tecido cutâneo, órgãos internos e/ou sistema nervoso central (BAKER & REBOLI, 1997; MITCHELL & PERFECT, 1995; NEILSON et al., 1977; PERFECT, 1989; POWELL et al., 1972). O *Cryptococcus spp.* é encontrado em árvores e no solo, comumente associado a fezes de pombos ou aves. Esses animais, especialmente o pombo, podem ter sido responsáveis pela disseminação desse fungo no mundo. Além disso, o *Cryptococcus spp.* pode infectar diferentes tipos de animais, como cabras, gatos e coalas, e ainda interagem com outros microorganismos como bactérias ou outros fungos (Figura 3) (LIN & HEITMAN, 2006).

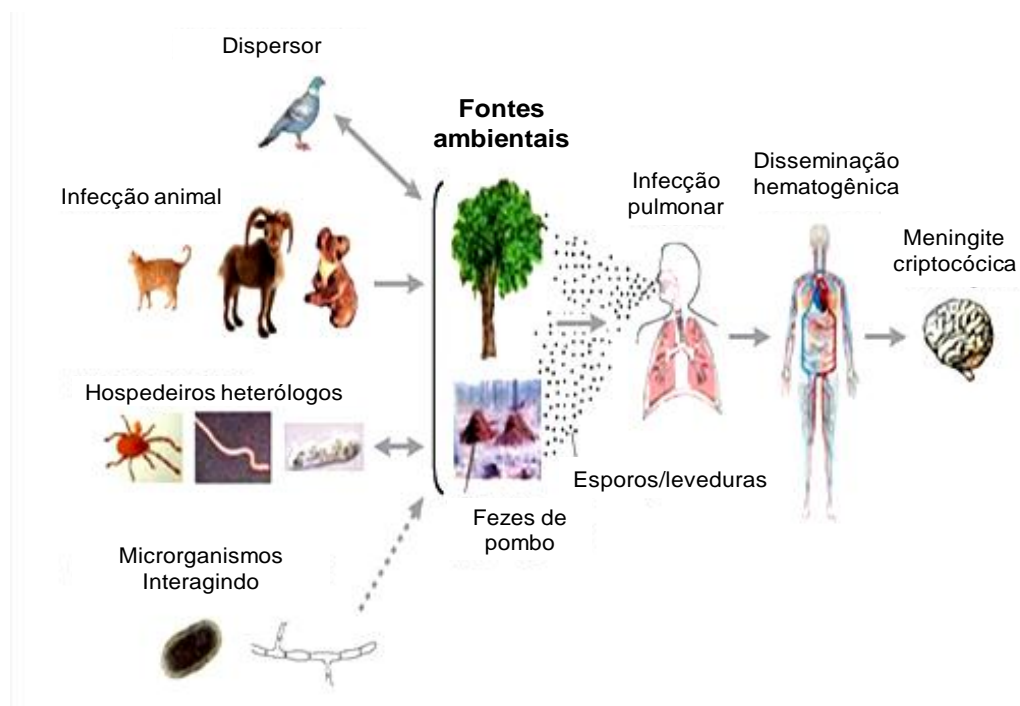


Figura 3: Ciclo de infecção do *Cryptococcus*.

Fonte: Adaptado de Lin & Heitman, 2006.

A maioria dos casos de infecção pelo *Cryptococcus* é assintomática e as leveduras podem permanecer latentes nos linfonodos pulmonares, onde podem morrer ou serem reativadas em um momento de imunossupressão. Nesta circunstância, a forma latente pode voltar a se reproduzir e se disseminar pela corrente sanguínea causando uma doença sistêmica ou afetando outro órgão ou tecido (CASADEVALL & PERFECT, 1998).

Ainda é discutível se a criptococose é causada por uma infecção aguda ou se é a reativação de infecção latente. No entanto, algumas evidências sugerem que a reativação de uma infecção latente pode ser a apresentação mais comum (DROMER et al., 1992; GARCIA-HERMOSO et al., 1999). A infecção aguda foi demonstrada por Nosanchuk et al. (2000), que apresentou evidências de transmissão de *Cryptococcus* das fezes de um pássaro (*Cacatua alba*) a um paciente imunocomprometido, uma vez que os isolados do paciente e das fezes do pássaro apresentavam perfis bioquímicos e padrões de RFLP e cariotipagem indistinguíveis.

Após a infecção pulmonar, tanto *C. neoformans* quanto *C. gattii* disseminam-se via hematogênica e atravessam a barreira hematoencefálica. Alguns estudos vêm mostrando o *C. neoformans* alcança o SNC através de dois prováveis mecanismos: a transcitose e a chamada estratégia de “cavalo de Tróia”. O primeiro ocorre pela captação direta das células fúngicas pelas células endoteliais e transmigração pelo citoplasma para alcançar o cérebro. Já o segundo, envolve a migração de fagócitos contendo células criptocócicas através do endotélio com subsequente expulsão dessas células no parênquima cerebral. Dentro do fagócito, o fungo se protegeria do ataque do sistema imunológico (Figura 4) (CASADEVALL, 2010; CHANG et al., 2004; CHARLIER et al., 2009; KRONSTAD et al., 2011; MA & MAY, 2009).

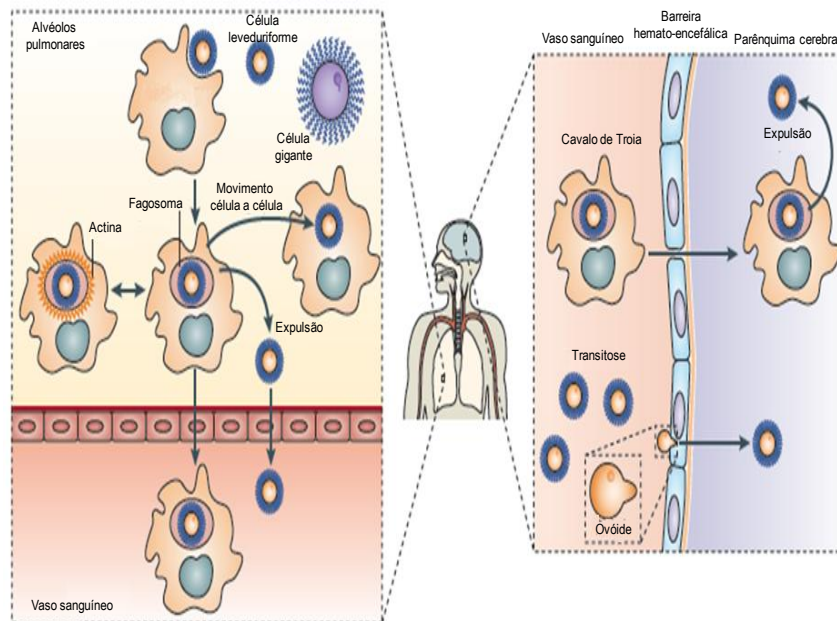


Figura 4: Interação do *Cryptococcus* com as células fagocíticas e a disseminação através da barreira hematoencefálica.

Fonte: Adaptado de Kronstad et al., 2011.

4.4 CICLO REPRODUTIVO

O *Cryptococcus* pode ser isolado de humanos e do ambiente sob a forma de levedura em brotamento. No entanto, a levedura também pode passar por uma transição dimórfica ficando na forma filamentosa através de duas vias de diferenciação: o *mating* e a frutificação monocariótica (Figura 5) (IDNURM et al., 2005).

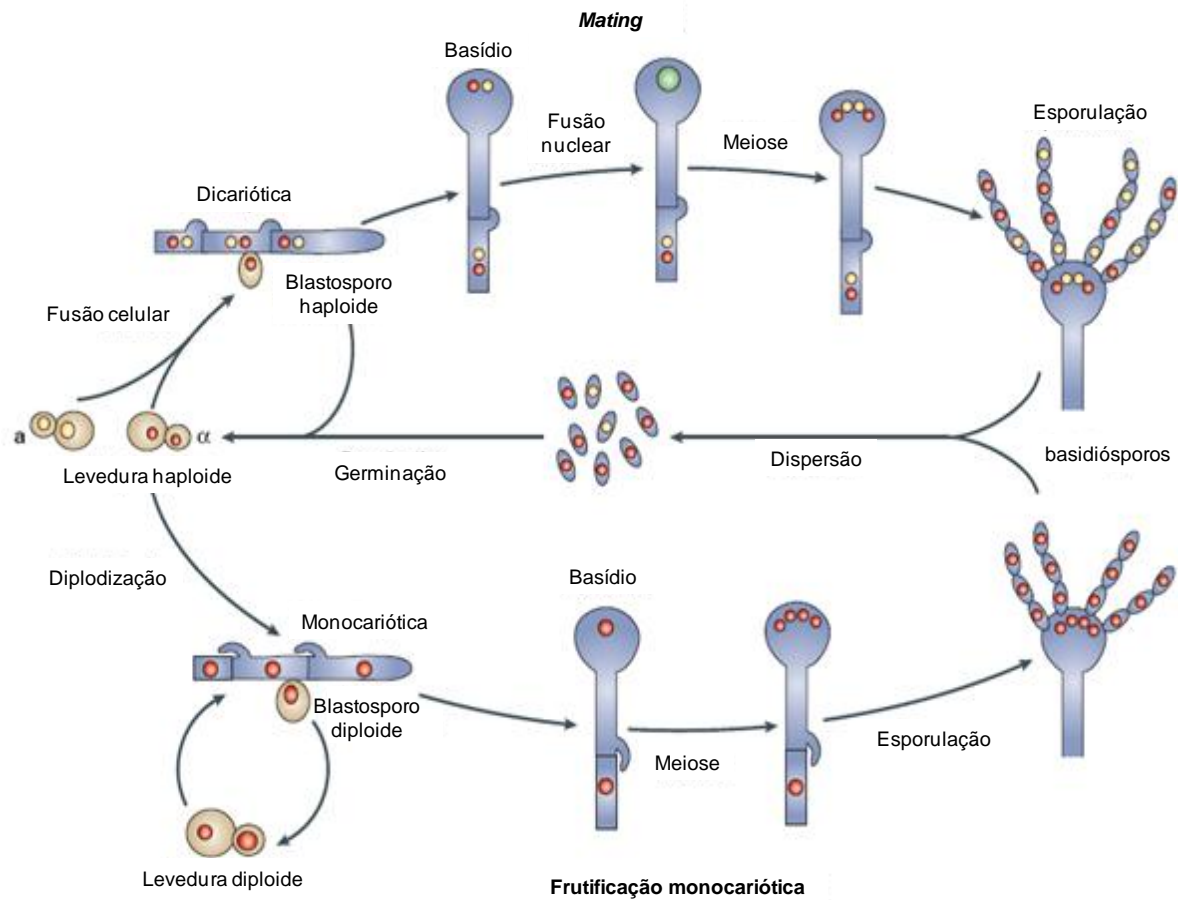


Figura 5: Modelo do ciclo reprodutivo do *Cryptococcus* spp.

Fonte: Adaptado de Idnurm et al., 2005.

A via de diferenciação por *mating* é considerada o ciclo sexual do *Cryptococcus* e envolve a fusão de células haplóides de tipos sexuais diferentes, **a** e **α**, para produzir filamentos dicarióticos, que eventualmente levam a formação de um basídio, no qual ocorre a meiose para produzir 4 cadeias de basidiósporos (KWON-CHUNG, 1975; 1976).

Na frutificação monocariótica, as células de um mesmo tipo sexual tornam-se diplóides por endoduplicação ou por fusão nuclear, seguido pela fusão de duas células. As hifas monocarióticas diplóides formam grampos de conexão que não são fundidos a célula anterior. A meiose ocorre na fase de desenvolvimento do basídio e são produzidos basidiósporos haplóides (IDNURM et al., 2005).

As cepas de *Cryptococcus* podem se diferenciar e sofrer frutificação monocariótica. Nessa via de diferenciação, as células **α** (e em menor quantidade as células **a**) respondem à limitação de nutrientes através da filamentação e esporulação. Anteriormente, a frutificação monocariótica era tida como uma forma

de reprodução assexuada, haplóide e mitótica, mas recentemente foi reconhecido que a frutificação pode ocorrer como uma forma de reprodução sexuada entre cepas com o mesmo tipo sexuado (LIN, 2009; LIN et al., 2005). Apesar do *mating* e da frutificação monocariótica apresentarem aspectos morfológicos semelhantes, as hifas produzidas na frutificação são mononucleadas com grampo de conexão não fundidos enquanto que no *mating*, as hifas possuem dois núcleos e estão ligadas com grampos de conexão fundidos. Um aspecto curioso da frutificação monocariótica é a sua predominância nas cepas α , podendo ser uma das explicações para a abundância de cepas α entre isolados clínicos e ambientais (TSCHARKE et al., 2003; WICKES et al., 1996).

O *mating* e a frutificação monocariótica podem ser estimulados por condições ambientais semelhantes como privação de nitrogênio, dessecação, escuridão e feromônios e ambas vão desenvolver hifas com grampos de conexão com subsequente produção de estruturas de frutificação nas extremidades (WICKES et al., 1996).

4.5 FATORES DE VIRULÊNCIA

Os fatores de virulência aumentam o grau de patogenicidade de um microorganismo, permitindo sua invasão e sobrevivência no hospedeiro. O *C. neoformans* apresenta inúmeros fatores de virulência como a presença de cápsula, produção de melanina, urease, fosfolipase, crescimento a 37°C e tipo sexuado (BUCHANAN & MURPHY, 1998).

4.5.1 Cápsula

A cápsula polissacarídica é uma estrutura notável e dá as células criptocócicas uma aparência distinta. Sua composição inclui manoproteínas (MP), galactoxilomanana (Galxm) e a glicuronoxilomanana (GXM), esta última principal constituinte (BHATTACHARJEE et al., 1984; ZARAGOZA et al., 2009).

As interações entre o *Cryptococcus* e a *Acanthamoeba castellanii* têm sido bastante investigadas. A *A. castellanii* é uma ameba de solo que se alimenta de

bactérias e fungos (RODRÍGUEZ-ZARAGOZA, 1994). As células de *Cryptococcus* são fagocitadas por esta ameba, resultando na replicação intracelular das células fúngicas e na formação de vesículas contendo polissacarídeos semelhantes às observadas em macrófagos (FELDMESSER et al., 2001; STEENBERGEN et al., 2001).

A cápsula fúngica também desempenha um papel significativo no dano aos órgãos e tecidos do hospedeiro. Em macrófagos, após a fagocitose, ocorre a fusão fagolisossomal com transferência de polissacarídeo capsular para os lisossomos. O tráfego lisossomal desordenado, resultante da presença do polissacarídeo, leva ao acúmulo de vacúolos citoplasmáticos e posterior rompimento da célula do hospedeiro com liberação de microorganismos para o meio extracelular (Figura 6). Isto mostra que a cápsula pode funcionar como um agressor intracelular e os polissacarídeos como componentes tóxicos envolvidos na citotoxicidade dos macrófagos (FELDMESSER et al., 2000; 2001; TUCKER & CASADEVALL, 2002).

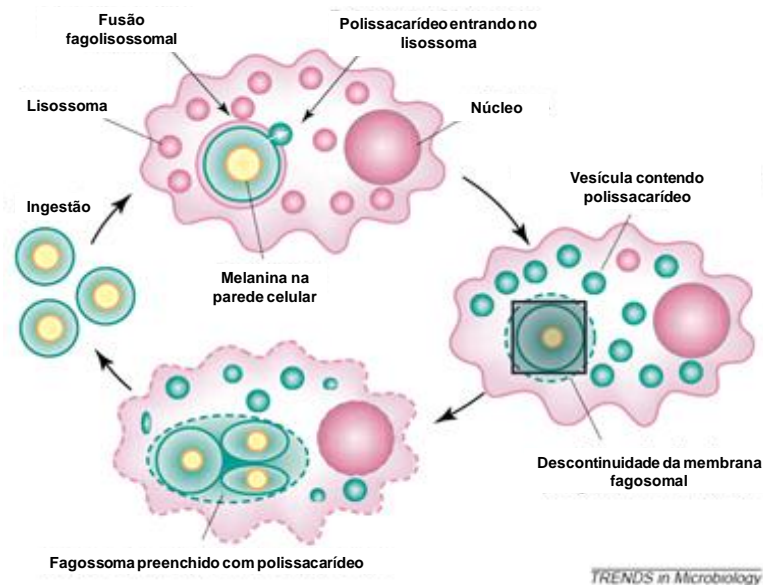


Figura 6: Esquema de infecção dos macrófagos pelo *Cryptococcus*.

Fonte: Adaptado de Feldmesser et al., 2001.

Vários estudos mostraram que cepas acapsuladas, obtidas naturalmente ou por mutagênese, eram menos virulentas do que as cepas capsuladas (CHANG & KWON-CHUNG, 1994; FROMTLING et al., 1982; JACOBSON et al., 1982). Foi demonstrado também que a adição de polissacarídeo purificado em isolados de

Cryptococcus com pouca ou nenhuma cápsula, tornava-os mais resistentes a fagocitose (BULMER & SANS, 1968; KOZEL & CAZIN, 1971).

Vários genes são essenciais para a biossíntese da cápsula como o CAP10, CAP59, CAP64 e CAP60 e sua deleção resulta em cepas com um fenótipo acapsular e avirulento (CHANG & KWONG-CHUNG, 1994; 1998; 1999; CHANG et al., 1996). Um estudo realizado por Chang e Kwon-Chung (1994) identificou que o gene CAP 59 está envolvido na formação da cápsula, e que a deleção desse gene promovia a formação de cepas acapsuladas e a perda de sua virulência. A evidência molecular de que a cápsula é um fator de virulência foi comprovada pela reintrodução do gene, tornando as cepas de *Cryptococcus* originalmente não virulentas em virulentas para os camundongos.

A cápsula também é capaz de inibir a fagocitose, uma vez que impede a ingestão de células fúngicas *in vitro* pelos fagócitos na ausência das opsoninas (KOZEL et al., 1988; 1996). Além disso, ela também é capaz de diminuir a resposta imunológica mediada por células T e de promover uma alteração na produção de citocinas com a diminuição do Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) e Interleucina-1 (IL-1), além do aumento na produção de Interleucina-10 (IL-10) (BUCHANAN & MURPHY, 1998).

4.5.2 Produção de melanina

Uma das características que diferenciam os isolados patogênicos de *C. neoformans* e *C. gattii* dos isolados não patogênicos e outras espécies de *Cryptococcus* é a habilidade das cepas patogênicas de produzirem um pigmento marrom em meio de cultura (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992).

A produção de melanina é outro fator de virulência bastante estudado. O fungo produz uma enzima chamada de fenoxidase que age sobre os compostos difenólicos presentes no meio levando a produção do pigmento melanina (SHAW & KAPICA, 1972).

Análises bioquímicas sugerem que a melanogênese é realizada pela conversão de dihidroxifenóis como a 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) em dopaquinona, sendo essa reação catalisada pela fenoxidase. As etapas subsequentes, tais como a reorganização da dopaquinona em dopacromo e a

autoxidação da melanina são espontâneas (Figura 7) (POLACHEK & KWON-CHUNG, 1988). Como o *Cryptococcus* não possui a tirosinase, necessária para a produção endógena de dihidroxifenóis (TORRES-GUERERRO & EDMAN, 1994), ele deve adquirir compostos difenólicos de seu ambiente de crescimento e possuir a fenoloxidase para converter esses compostos em intermediários da melanina.

O cérebro, por ser um tecido rico em catecolaminas, como a DOPA, é o alvo favorito das infecções pelo *Cryptococcus*, uma vez que o SNC permite ao fungo a obtenção de diversos substratos necessários para a formação de melanina (POLACHEK et al., 1990). Essa afirmação é consistente, pois as áreas do cérebro que são ricas em catecolaminas, como os gânglios basais, são frequentemente infectadas pelo *Cryptococcus* durante meningoencefalite criptocócica (LEE et al., 1996).

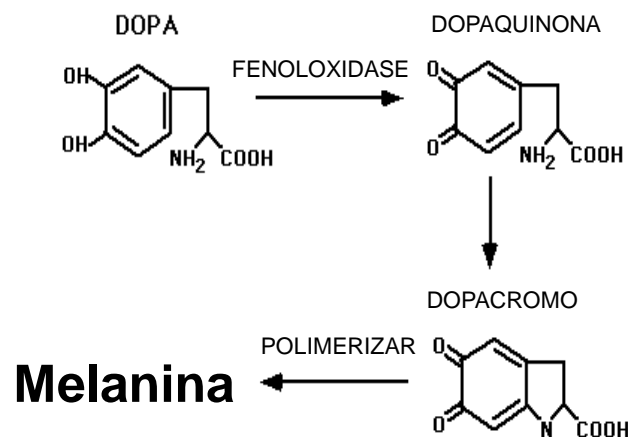


Figura 7: Mecanismo proposto para a produção de melanina pelas cepas patogênicas de *Cryptococcus*.

Fonte: Adaptado de Buchanan & Murphy, 1998.

Em um estudo feito com murinos infectados com *Cryptococcus* foi possível observar, em vários momentos após a infecção através da análise de tecido, o espessamento e escurecimento da parede celular fúngica, caracterizando a produção de melanina (NOSANCHUK et al., 1999).

De acordo com alguns estudos *in vitro*, as células de *Cryptococcus* melanizadas são menos susceptíveis aos efeitos fungicidas da luz ultravioleta, mostrando que a melanina possui um papel protetor para sobrevivência da célula no

meio ambiente já que o *Cryptococcus* é comumente encontrado nas fezes de pombos no estado melanizado (WANG & CASADEVALL, 1994a).

Vários estudos tem associado a síntese da melanina com a virulência. No hospedeiro, a melanina pode agir como um antioxidante protegendo o fungo das células fagocíticas, impedindo a linfoproliferação e a produção de TNF- α , uma das principais moléculas sinalizadoras da resposta inflamatória mediada por células T, pelos macrófagos (BLACKSTOCK et al., 1999).

Ikeda et al. (2003) avaliaram a susceptibilidade de células melanizadas e não melanizadas de *C. neoformans* e *Cryptococcus albidus* aos antifúngicos (anfotericina B e fluconazol). A presença da melanina não alterou a Concentração Inibitória Mínima (CIM), mas as células melanizadas de *C. neoformans* apresentaram-se mais resistentes a morte na presença de anfotericina B do que as células não melanizadas. Além disso, as células de *Cryptococcus* melanizadas mostraram-se menos susceptíveis aos efeitos fungicidas de espécies reativas de nitrogênio, bem como de espécies reativas de oxigênio do que as não melanizadas. Isso mostra a importância da produção de melanina pela fenoloxidase, pois confere proteção às células fúngicas contra os oxidantes gerados pelas células efectoras do sistema imunológico (JACOBSON & TINNELL, 1993; WANG & CASADEVALL, 1994b; WANG et al., 1995).

4.5.3 Urease

A urease hidrolisa a uréia em amônia e carbamato promovendo um aumento localizado de pH. Este princípio pode ser utilizado para identificar microorganismos através de alterações colorimétricas promovida por essa mudança no pH. Como a atividade da urease está presente na maioria dos isolados clínicos de *Cryptococcus* e ela é o fator de virulência de várias bactérias patogênicas, esta enzima tem sido considerada como um provável fator de virulência do *Cryptococcus* (CASADEVALL & PERFECT, 1998; COX et al., 2000). Olszewski et al. (2004) demonstraram que a atividade da urease aumenta a capacidade desse fungo em invadir o SNC.

4.5.4 Fosfolipase

As fosfolipases possuem a capacidade de hidrolisar uma ou mais ligações éster, contribuindo para a degradação e desestabilização da membrana da célula do hospedeiro, causando sua lise (GHANNOUM, 2000). A atividade das fosfolipases se deve a um único gene, *PBL1*, que apresenta 3 atividades: fosfolipase B, hidrolase lisofosfolipase (LPL) e transacetilase lisofosfolipase (COX et al., 2001).

4.5.5 Crescimento a 37°C

Uma característica de virulência essencial é a sua habilidade de crescer em temperatura fisiológica. Os fungos estão por toda parte, mas menos de 0,01% deles possuem a habilidade de causar doenças em humanos, pois a maioria dos fungos ambientais não possui a habilidade de crescer a 37°C. Por causa disso, a habilidade do *Cryptococcus spp.* de crescer em temperatura fisiológica é essencial para sua virulência (STEENBERGEN et al., 2003).

4.5.6 Tipos Sexuados

As células de *Cryptococcus spp.* possuem dois tipos de *mating type* (MAT): α e **a**. A maioria das cepas de *Cryptococcus* são MAT α , podendo ser de 30 a 40 vezes mais prevalentes do que o MAT **a**, em ambas as amostras clínica e ambiental (CASADEVALL & PERFECT, 1998; CASALI et al., 2003; KWON-CHUNG & BENNETT, 1978; SPRINGER & CHATURVEDI, 2010). Estudos realizados em modelos animais determinaram que o MAT α era significativamente mais virulento quando comparado ao MAT **a**. Isto explica a predominância de isolados MAT α sobre o MAT **a** (CASADEVALL & PERFECT, 1998; KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; 1978; KWON-CHUNG et al., 1992; MADRENYS et al.; 1993; PEDROSO et al., 2010).

O tipo sexuado pode apresentar um importante papel no neurotropismo, uma vez que as células do tipo MAT α possuem uma maior predileção em penetrar no SNC durante coinfeções com cepas **a** e α (NIELSEN et al., 2005).

4.6 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

O Sistema Nervoso Central e o trato respiratório são os principais órgãos afetados durante a infecção pelo *Cryptococcus spp.* As manifestações clínicas, normalmente, estão associadas ao estado imunológico do indivíduo que pode permanecer assintomático ou desenvolver a doença disseminada com falência respiratória (KON et al., 2008).

O acometimento do parênquima cerebral e das meninges ocorre em mais de 80% dos casos de criptococose, uma vez que essa levedura apresenta uma predileção pelo SNC. Os sinais e sintomas normalmente observados são dor de cabeça, febre, vômito, rigidez de nuca, letargia, alteração de consciência entre outros (CHAYAKULKEEREE & PERFECT, 2006; KON et al., 2008). As principais complicações nesses casos hidrocefalia, déficit motor focal e aumento da pressão intracraniana, o que pode aumentar significativamente a morbi-mortalidade da doença (SUBRAMANIAN & MATHAI, 2005).

O pulmão é o segundo órgão mais afetado e consiste na porta de entrada para o *Cryptococcus spp.* Os sintomas observados em pacientes com criptococose pulmonar aguda são febre, tosse, dor no peito e perda de peso (CHAYAKULKEEREE & PERFECT, 2006), no entanto, 1/3 dos casos é assintomático (KON et al., 2008). Outros locais do corpo também podem ser afetados como ossos (MORRIS & WOLINSKY, 1965), pele (LINGEGOWDA et al., 2011) e próstata (LARSEN et al., 1989).

4.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial da criptococose é realizado, principalmente, através da visualização direta de leveduras encapsuladas em material biológico, seguido pelo seu isolamento em cultura (OSUNA et al., 2008).

4.7.1 Microscopia

Através da tinta da China é possível observar pelo microscópio óptico, a presença de leveduras encapsuladas em uma grande variedade de espécimes clínicos como o escarro, líquido cefalorraquidiano, lavado brônquico, secreção de abscesso, urina, aspirado de medula óssea e de linfonodos e fragmentos de tecidos. Além da tinta da China, a solução de 0,1% de branco de calcoflúor também facilita a visualização desses elementos fúngicos utilizando microscópio de imunofluorescência (KON et al., 2008; MITCHELL & PERFECT, 1995).

As leveduras são identificadas pela visualização de um nítido halo claro ao redor da célula, revelando a presença da cápsula através do contraste negativo fornecido pela Tinta da China (BOSE et al., 2003; MITCHELL & PERFECT, 1995; OKABAYASHI et al., 2007). A sensibilidade desse teste é de 80% nos pacientes com aids e de 50% em pacientes HIV negativo (KON et al., 2008). A centrifugação do LCR pode aumentar a sensibilidade deste teste, no entanto pode ocorrer a formação de artefatos, como linfócitos lisados, que podem ser confundidos com células criptocócicas (THIRUCHELVAN et al., 1998).

4.7.2 Cultivo

As leveduras do gênero *Cryptococcus* crescem bem a 37°C em meios comuns utilizados na micologia como Agar Sabouraud Dextrose dentro de 36 a 72 horas. Devido a presença da cápsula polissacarídica, as cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* apresentam um aspecto macroscópico mais mucóide, cremoso, de cor branco amarelado e com margem lisa e inteira quando semeados no meio citado acima (MITCHELL & PERFECT, 1995). Observando a figura 8, é possível notar que as colônias de *C. gattii* geralmente apresentam-se mais mucóides e úmidas do que as colônias de *C. neoformans* (RAMÍREZ, 2008).



Figura 8: Cultivo de *Cryptococcus* em Agar Sabouraud Dextrose: À esquerda *C. neoformans* e à direita *C. gattii*.

Fonte: Ramírez, 2008.

As duas espécies de *Cryptococcus* podem ser diferenciadas por uma reação de cor quando esse fungo cresce em agar CGB. Um teste positivo indica uma mudança no pH de $5,8 \pm 0,1$ (amarelo esverdeado) a pelo menos 7,0 (azul cobalto) (KOWN-CHUNG et al., 1982). O *C. gattii* possui a habilidade de utilizar a glicina como uma fonte de carbono e nitrogênio e é resistente a L-canavalina, permitindo a sua diferenciação do *C. neoformans*, como mostra a figura 9 (KON et al., 2008; MIN & KWON-CHUNG, 1986; POLACHECK & KWON-CHUNG, 1986).

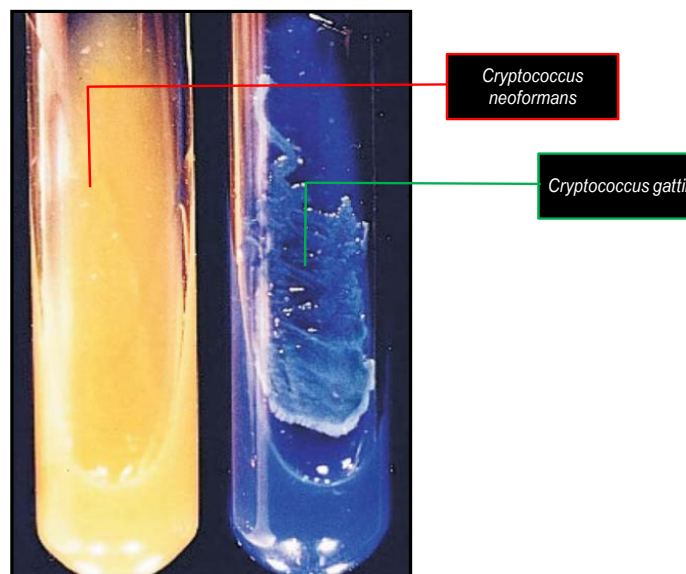


Figura 9: Meio de cultura CGB evidenciando a diferença entre *C. neoformans* (amarelo) e *C. gattii* (azul).

Fonte: Adaptado de Martinez, 2008.

A capacidade de produzir melanina com formação de colônias marrons em meios contendo compostos fenólicos é característica do *C. neoformans* e do *C. gatti*, não sendo observado em outras espécies do gênero *Cryptococcus* e nem em outras leveduras de interesse médico, possuindo raras exceções (KON et al., 2008).

4.7.3 Diagnóstico imunológico

A glicuronoxilomanana (GXM), principal constituinte da cápsula fúngica pode ser detectada pelos testes de aglutinação do látex utilizando diversos espécimes clínicos como sangue, urina, lavado broncoalveolar e no Líquido cefalorraquidiano (LCR). Mas na prática, a detecção do antígeno capsular polissacarídico é feita no LCR e no soro (SWINNE & VROEY, 1992). A aglutinação do látex é um teste cuidadoso, simples, rápido e disponível no comércio que possui uma sensibilidade de 95% e uma especificidade de 98% (KON et al., 2008).

Para o diagnóstico imunológico também pode ser utilizado os testes de ELISA tanto para a detecção de antígenos quanto de anticorpos. Esse teste pode detectar antígenos em títulos mais baixos e, portanto, mais precocemente na infecção criptocócica. Entretanto, trata-se de um teste mais demorado e trabalhoso. A detecção de anticorpos pelo ELISA é mais difícil, pois, geralmente, eles não estão presentes durante a infecção ativa, podendo aparecer somente durante o tratamento e com a recuperação do paciente (KON et al., 2008).

4.8 TRATAMENTO

As principais drogas utilizadas no tratamento da criptococose são: anfotericina B, anfotericina B nas formulações lipídicas, 5-fluocitosina (5-FC) e os azólicos (fluconazol).

A anfotericina B (AMB) alterou o perfil da criptococose disseminada de infecção fatal para infecção curável. Com isso, esse fármaco tem sido utilizado com sucesso para tratar todas as formas de criptococose. Por causa de sua toxicidade, principalmente para os rins, a terapia tem sido combinada a 5-Fluocitosina com o objetivo de reduzir a dose e a duração do tratamento. Além disso, também é

possível utilizar formulações com lipídios para tratar a meningite criptocócica como a AMB lipossomal (COKER et al., 1993; SCHÜRMAN et al., 1991), dispersão coloidal AMB (HOSTETLER et al., 1992) e o complexo lipídico AMB (ABLC) (CLARK et al., 1991; PERFECT & WRIGHT, 1994; SHARKEY et al., 1996), pois nesses casos a toxicidade é reduzida permitindo que doses maiores sejam toleradas (MITCHELL & PERFECT, 1995).

A 5-fluocitosina (5-FC) é um fármaco que possui um potencial mielotóxico e hepatotóxico, devendo ter o cuidado com seu uso, acompanhando o paciente com exames laboratoriais de controle como hemograma, hepatograma, e função renal. Quando usada na dosagem de 100mg/kg/dia, por Via Oral (VO) ou Intravenosa (IV), este fármaco não tem apresentado efeitos tóxicos significativos, não tendo necessidade de realizar as dosagens séricas (BROUWER et al., 2007).

O fluconazol deve ser iniciado na fase de consolidação, no momento em que o paciente apresentar melhora clínica definida por: melhora do *status* mental, febre, cefaléia, sinais meníngeos e/ou negatização da cultura do LCR na 2ª semana (LARSEN et al., 1990). Um problema observado em relação ao uso do fluconazol é a indução de resistência, embora rara, ocorre pelo fato desse fármaco ser fungistático e não induzir à esterilização precoce do LCR. Por isso não é recomendável para terapêutica de ataque e sim, preferencialmente para a manutenção (BICANIC et al., 2006).

Para indivíduos sem doença imunossupressora aparente e com neurocriptococose, a literatura mostra amplamente a superioridade do tratamento com Anfotericina B desoxocolato (0,7-1 mg/kg/dia) mais 5-Flucitosina (100 mg/kg/dia) por 6-10 semanas em relação à anfotericina em monoterapia e outros antifúngicos. Infelizmente, a 5-Flucitosina não está mais disponível no Brasil, o que prejudicou a eficácia do tratamento com chances de cura. O uso de Anfotericina B lipossomal permite uma dosagem mais elevada da droga em curto espaço de tempo, o que parece aumentar a possibilidade de cura e de prevenção das seqüelas graves (KON et al., 2008).

O tratamento das formas pulmonares é sempre recomendado aos pacientes que apresentam sintomas e/ou, com doença disseminada e/ou com antígeno criptocócico positivo e/ou com imunossupressão (Tabelas 1 e 2). Em um primeiro momento, os pacientes com as formas pulmonares localizadas, assintomáticos, oligossintomáticos ou com nódulo pulmonar ressecado podem ser observados sem

o uso de antifúngicos. Nestas situações é importante que se faça uma avaliação criteriosa do risco de disseminação para outros locais, além de possível imunodepressão. Outra possibilidade de manejo é introduzir a terapêutica específica em todos os casos de criptococose pulmonar, independente da presença de sintomatologia (SAAG et al., 2000).

Tabela 1: Tratamento das formas pulmonares de criptococose em HIV negativo. Pacientes com pesquisa de antígeno criptocócico e cultura em LCR negativas.

Estado imunológico	Forma clínica	Tratamento	Duração (dose total)	Evidência
Imunocompetente ou	leve/	fluconazol 200-400mg/d ou	6 a 12 meses	AIII
Imunodeprimido:	moderada	itraconazol 200-400mg/d VO ou		BIII
HIV negativo		anfotericina B 0,5-1mg/kg/d		BIII
	grave	tratar como meningoencefalite		

*em todos os casos determinar *Cryptococcus* no LCR: se cultura ou pesquisa direta e/ou látex positivos: tratar como infecção em SNC

Fonte: KON et al., 2008.

Tabela 2: Tratamento das formas pulmonares de criptococose: HIV positivo ou cultura positiva de espécime respiratório, sem envolvimento do SNC.

Forma leve/moderada		
Antifúngico	Dose e duração	Evidência
Fluconazol	200 a 400mg/dia VO por 6 a 12 meses	AIII
Ou	(vide observação)	
Itraconazol	200 a 400mg/dia VO por 6 a 12 meses	BIII
	(vide observação)	
Manutenção	fluconazol 200 a 400mg/dia ou itraconazol 200 a 400mg/dia	CIII
Forma grave	tratar como meningoencefalite	

* Em todos os casos determinar *Cryptococcus* no LCR: se cultura ou pesquisa direta e/ou látex positivos: tratar como infecção em SNC.

Em pacientes com aids e linfócitos T CD4+ > 100 a 200 células/mm³ por mais de 6 meses e aderentes a TARV, pode ser considerada a suspensão da terapêutica antifúngica de manutenção (CIII).

Fonte: KON et al., 2008.

O tratamento das formas graves, principalmente quando ocorre o envolvimento do SNC, seja o paciente infectado ou não pelo HIV, a fase de indução apresenta a finalidade de negativar ou reduzir de forma efetiva a carga fúngica,

possuindo como período mínimo de tratamento de duas semanas. A fase de consolidação consiste em manter a negatividade micológica e normalizar os parâmetros clínicos e laboratoriais, por pelo menos oito semanas. Após a fase de indução e consolidação, temos a fase de manutenção que apresenta duração mínima de 1 ano com tempo adicional variando de acordo com a condição do estado imunológico do hospedeiro. Essa terapia de manutenção tem sido indicada pelo elevado risco de recaída em pacientes com elevada imunossupressão e em pacientes com aids, enquanto os linfócitos T CD4+ estiverem em níveis abaixo de 100 células/mm³. Após a estabilização dos linfócitos T CD4+ (> 100 a 200 células/mm³), por mais de 6 meses, em pacientes que estão fazendo a terapia antirretroviral (TARV) , pode-se considerar a suspensão da terapia de manutenção (BENSON *et al.*, 2004 *apud.* KON et al., 2008). As tabelas 3 e 4 mostram o manejo de tratamento da neurocriptococose em pacientes com HIV negativo e com HIV positivo.

Tabela 3: Tratamento da neurocriptococose em pacientes HIV negativos.

Indução	Consolidação
Anfotericina B: 0,7 a 1mg/kg/dia IV + 5-Fluocitosina: 100mg/kg/dia VO ÷ 4 doses; por 2 semanas	fluconazol 400mg/dia VO por 6 a 10 semanas
Anfotericina B: 0,7 a 1mg/kg/dia IV + 5FC: 100mg/kg/dia VO por 6 a 10 semanas	
Anfotericina B: 0,7 a 1mg/kg/dia IV por 6 a 10 semanas	
Casos refratários ou intolerância à anfotericina B	
Anfotericina B lipossomal 3 a 6mg/kg/dia por 6 a 10 semanas	
Anfotericina B complexo lipídico 5mg/kg/dose (diário por 2 semanas e 3X semana por 4 semanas; dose média acumulativa = 3g)	

Fonte: KON et al., 2008.

Tabela 4: Tratamento da criptococose do Sistema Nervoso Central ou disseminada em pacientes com HIV positivo ou outras formas de imunossupressão.

Indução	Consolidação
Anfotericina B: 0,7 a 1mg/kg/dia + 5-Fluocitosina: 100mg/kg/dia ÷ 4 doses VO por 2 semanas	fluconazol: 400mg/dia VO por 10 semanas
Esquemas alternativos	
anfotericina B: 0,7 a 1mg/kg/dia por 6 a 10 semanas	
anfotericina B lipossomal 4 a 6mg/kg/dia por 6 a 10 semanas	
anfotericina B complexo lipídico 4 a 5 mg/Kg/dia por 6 a 10 semanas	
Em casos de intolerância ou impossibilidade de uso de anfotericina B e suas formulações lipídicas	
fluconazol: 800 a 1600mg /dia associado 5 FC 100mg/Kg/dia ÷ 4 doses VO, ou fluconazol: 1600 a 2000mg/dia por dia por 6 a 10 semanas ou fluconazol: 400 a 800mg/dia por 10 a 12 semanas	
*Manutenção 12 a 24 meses	
fluconazol: 200 a 400mg/dia, 1x dia, VO	
itraconazol: 200mg/dia 1X, VO	

Fonte: KON et al., 2008.

E mesmo com os avanços terapêuticos, ainda é difícil o tratamento da criptococose em indivíduos imunocomprometidos, o que pode levá-los a morte ou trazer sequelas neurológicas irreversíveis (ANAISSIE et al., 1989; LU et al., 2006).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo do tipo transversal, prospectivo, analítico.

5.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA DE ESTUDO

A amostra alvo foi composta pelos pacientes com criptococose de qualquer sítio, confirmada laboratorialmente, atendidos no Hospital Universitário João de Barros Barreto/UFGA, de janeiro de 2010 a dezembro de 2011, portadores ou não de uma doença imunossupressora, de ambos os gêneros e todas as idades, que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Neste estudo, serão considerados como criança, os pacientes que apresentarem idades entre 0 a 13 anos e adultos, os pacientes com idade acima de 13 anos.

O tamanho da amostra foi por conveniência, sendo incluídos todos os pacientes com confirmação laboratorial (pesquisa direta do fungo e/ou cultura) de infecção pelo *Cryptococcus spp.*

5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos todos os pacientes atendidos no Hospital Universitário João de Barros Barreto com criptococose confirmada laboratorialmente (pesquisa direta e/ou cultura positivas para *Cryptococcus spp.*), atendidos no período de estudo, de ambos os sexos e todas as idades, com ou sem doença imunossupressora, que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A).

5.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos os casos que não tiveram as variáveis do estudo descritas claramente nos prontuários.

5.5 COLETA DE DADOS

Os dados pessoais, clínicos e laboratoriais foram coletados a partir da revisão dos prontuários do arquivo médico do HUIBB (DAME). Foram analisadas as seguintes variáveis que constam na ficha clínico-epidemiológica individual (Apêndice B):

- a) Identificação: nome, endereço, sexo, data de nascimento, ocupação, estado civil, escolaridade, matrícula.
- b) Dados clínicos:
 - b.1 - Manifestações clínicas: febre, cefaléia, vômitos, desorientação, crises convulsivas, diminuição da acuidade auditiva, diminuição da acuidade visual, edema de papila, sinais meníngeos, hemiplegia, hemiparesias, lesões cutâneas.
 - b.2 – Co-morbidades: *Diabetes mellitus* tipo 1 ou 2, Lupus eritematoso sistêmico, corticoterapia, gravidez, uso de imunossupressores, hepatopatia crônica, HIV positivo.
 - b.3 – Evolução: cura, óbito, seqüela.
- c) Exames laboratoriais: análise do LCR, isolamento do agente em outra lesão e contagem de linfócitos T CD4+ (quando HIV+).

5.6 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA

A identificação fenotípica dos isolados de *Cryptococcus* spp. foi realizada no Laboratório de Microbiologia do HUIBB. Isolados de leveduras suspeitas de origem humana (leveduras fenol-oxidase positivas em meio NSA) foram identificados e caracterizados morfológica e bioquimicamente como integrante do gênero *Cryptococcus* spp. (termotolerância 25 e 37°C, fermentação, assimilação de fontes de carbono e nitrogênio (Vitek 32-BioMerieux)). A diferenciação entre as espécies foi realizada através do teste em meio CBG (canavanina-glicina-azul de bromotimol). Após a confirmação do gênero e da espécie, os isolados foram repicados em agar Sabouraud para realização da extração de DNA, assim como foi reservado amostras em duplicata para serem armazenadas em glicerol a -70°C.

5.7 EXTRAÇÃO DE DNA

Após 36 a 48 horas de crescimento do fungo em ágar sabourad, aproximadamente duas alçadas cheias da massa fúngica foram colocadas em 300 µL de NET/SDS e posteriormente, homogeneizadas. A essa solução foi adicionado 4 µL de proteinase K em uma concentração de 10µL/mL e incubado em banho-maria a 42°C por 16 horas. No dia seguinte, foi adicionado a solução igual volume de fenol e clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e agitado levemente por inversão durante 5 minutos. A solução foi centrifugada a 5.000 rpm por 10 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo de 1,5 mL estéril e repetida a fase do fenol e clorofórmio:álcool isoamílico.

Após a segunda centrifugação, foi transferida a fase superior para outro microtubo limpo e adicionado igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) . A solução foi agitada levemente por inversão durante 5 minutos e centrifugada a 5.000 rpm por 10 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado 1/10 do volume de acetato de sódio a 3M e 2 ½ vezes do volume de etanol absoluto a 4°C. Após homogeneizar, a solução foi deixada a -20°C por 16 horas para precipitação do DNA.

No dia seguinte, as amostras foram deixadas em temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão e foi adicionado ao precipitado de DNA 500 µL de etanol a 75%. O microtubo com a amostra foi agitado no vórtex e centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos. Após centrifugação, o etanol foi desprezado por inversão e a fase do etanol a 75% foi repetida mais duas vezes. Após descartar o etanol a 75%, a amostra foi incubada em estufa a 37°C por 15 minutos e solubilizada em 20 µL de tampão TE (1x).

5.8 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO TIPO SEXUADO

A identificação do tipo sexuado foi feita através de reação de PCR com iniciadores dos genes de ferômonio MAT α e MAT β segundo Chaturvedi et al. (2000) e Fraser (2003) (Quadro 1). Para determinação do tipo sexuado foram utilizados os seguintes pares de iniciadores:

Quadro 1: Iniciadores específicos codificadores dos genes do feromônio de cada tipo sexuado (MAT a e MAT α).

Iniciador específico para MAT α	Iniciadores específicos para MAT a
5'-CTTCACTGCCATCTTCACCA-3'	5'-CGCCTTCACTGCTACCTTCT-3'
5'-GACACAAAGGGTCATGCCA-3'	5'-AACGCAAGAGTAAGTCGGGC-3'

Os iniciadores específicos para o tipo sexuado α geram um fragmento de 101 pb e os iniciadores específicos para o tipo sexuado a originam um fragmento 117 pb. A reação de PCR foi realizada com volume final de 25 μ L e cada reação possuía 1 μ L de DNA, 1X tampão PCR, 1,5 μ L de $MgCl_2$ (3 mM), 2 μ L de dNTP's (0,1 mM) (Invitrogen), 100 ng de cada iniciador e 0,5 μ L de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen) (2,5U). A reação de PCR foi realizada com uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturação, 57,5°C por 30 segundos para o anelamento e 72°C por 30 segundos para a extensão e 1 ciclo a 72°C por 5 minutos em um termociclador (Biocycler). Os produtos da amplificação foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio a 100V por 1 hora em TAE (Figura 10). Foi utilizado o marcador de peso molecular de 50 pb (Biolabs).

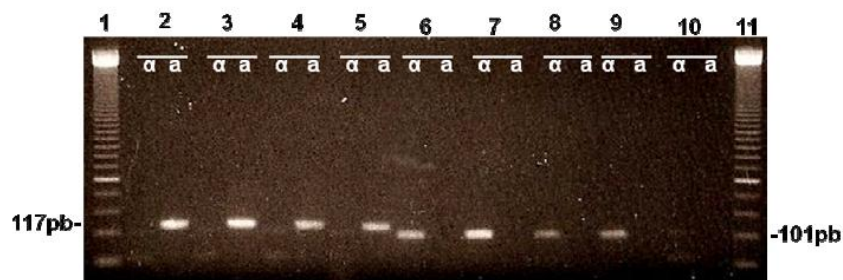


Figura 10: Gel de agarose demonstrando os tipos sexuais através dos iniciadores para MAT a e MAT α de seis isolados ambientais. 1 e 11: peso molecular; 2-4 e 7-9: isolados ambientais; 5: Controle positivo para MAT a; 6: Controle positivo para MAT α ; 10: Controle negativo.

Fonte: Costa, 2008.

5.9 TIPAGEM MOLECULAR

Os mesmos isolados foram também tipados pela técnica de RFLP para análise do gene URA5. A reação de PCR foi realizada com volume final de 25µL. Cada reação tinha 1 µL de DNA, 1X tampão PCR (10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl) 1,5 µL de MgCl₂ (3 mM de cloreto de magnésio), 4 µL de dNTP's (0,2 mM de dNTP's), 0,5 µL de *Platinum Taq DNA polimerase* (Invitrogen) e 100 ng de cada iniciador URA5 (5' ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG 3') e SJ01 (5' TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC 3'). A reação de PCR foi realizada com uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos para desnaturação, 61°C por 45 segundos para o anelamento e 72°C por 1 minuto e 20 segundos para a extensão e 1 ciclo a 72°C por 10 minutos em um termociclador (Biocycler). O produto da PCR foi verificado por eletroforese em gel de agarose a 1% para a visualização de um fragmento de aproximadamente 800 bp (Figura 11). Em seguida, 20 µL do produto foi submetido a dupla digestão enzimática com Sau961 (5U/µl) e HhaI (20U/µl) durante a noite a 37°C e, então, separado por eletroforese em gel de agarose a 3% a 100V por 4 horas e visualizado sob luz Ultravioleta (UV). Os padrões de bandas obtidos por RFLP foram comparados visualmente com cepas padrão de cada tipo (VNI a VNIV e VGI a VGIV) como mostra a figura 12 (MEYER et al., 2003).

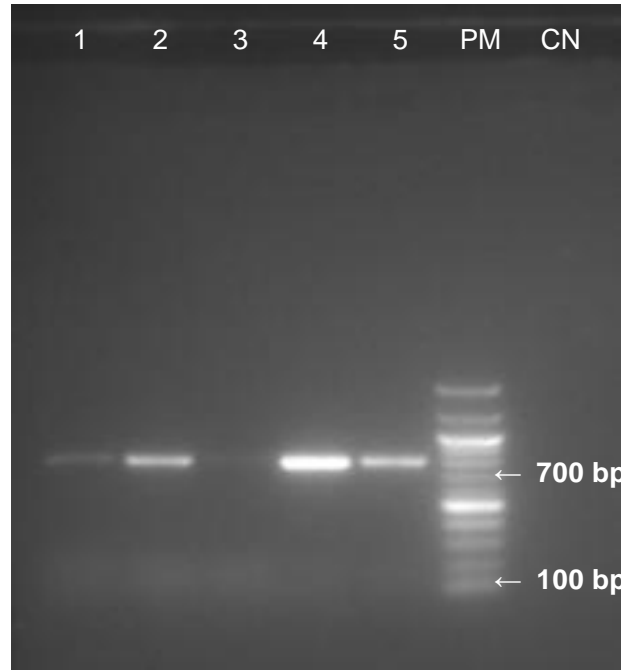


Figura 11: Perfil do PCR para o gene URA5. 1-4: Isolados clínicos. 5: Controle positivo. PM: Peso molecular 100 pb (Biolabs). CN: Controle Negativo.

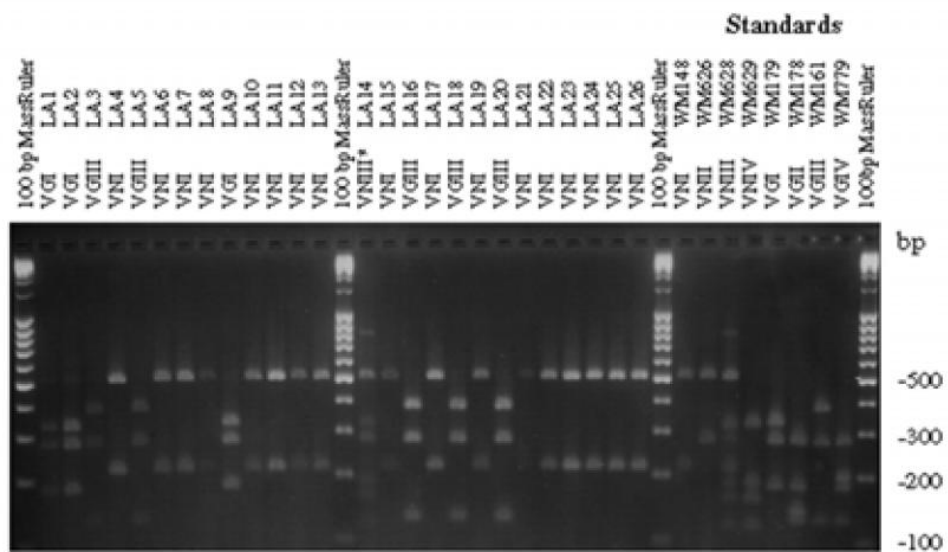


Figura 12: Gel de agarose ilustrando os tipos moleculares obtidos por PCR/RFLP. LM 794-801: Padrões de VNI-VNIV e VGI-VGIV, respectivamente.

Fonte: Meyer et al., 2003.

5.10 ANÁLISE DE SIMILARIDADE

Os isolados de *C. gattii* e *C. neoformans* foram tipados pelo método PCR-*fingerprinting* com sequência de minissatélite do fago M13 (5' GAGGGTGGCGGTTCT 3'). As reações de amplificação foram realizadas em volume de 50 µL contendo 25ng de DNA, 1X tampão PCR, 0,2 mM de dNTP's, 3 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 30 ng do iniciador e 2,5 U Taq DNA polimerase. A reação de PCR foi realizada em 35 ciclos, com 20 segundos de desnaturação a 94°C, 1 minuto de anelamento a 50°C, 20 segundos de extensão a 72°C, seguida de extensão final de 6 minutos a 72°C. O produto amplificado foi concentrado para cerca de 15 µL de volume e submetido a eletroforese em gel de agarose a 1,4% (corado com brometo de etídio 10mg/ml estoque) em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) a 70V por 14 centímetros, sendo então visualizado sob luz UV. O padrão de bandas de cada isolado foi comparado com o perfil de cepas-padrão de cada tipo (VNI a VNIV e VG1 a VGIV), amplificados em paralelo com os demais isolados. Todas as bandas visíveis foram incluídas na análise, independente de intensidade (MEYER et al., 2003).

5.11 FINANCIAMENTO DO PROJETO

O projeto intitulado "Neurocriptococose no Estado do Pará - Estudos Transversal Retrospectivo, Estudo Prospectivo e Avaliação Sensorial" foi aprovado pela FAPESPA (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará) no edital PPSUS 2009.

5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados clínicos e laboratoriais foram registrados em planilha de Microsoft Excell e analisados pelo programa Biostat 5.0. O teste de qui-quadrado foi usado para diferenças entre proporções e o teste de exato de Fisher foi usado quando os valores eram menores que 5. O nível de significância adotado foi de 0,05.

6 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho faz parte do projeto “Criptococose: Perfil da morbimortalidade dos pacientes atendidos em uma unidade de referência no estado do Pará.” que teve a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUIBB (ANEXO A). Todos os participantes da pesquisa foram informados previamente sobre a importância do estudo e depois foi solicitada sua permissão, através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme rege a Resolução 196/96, do Conselho Nacional de Saúde, sobre os aspectos éticos envolvendo a pesquisa com seres humanos.

7 RESULTADOS

No período de janeiro de 2010 a dezembro de 2011 foram diagnosticados 59 casos de criptococose no HUIBB, associados ou não a AIDS. Destes casos, 30 ocorreram em 2010 e 29 em 2011. Os meses que apresentaram mais casos foram janeiro, fevereiro e agosto em 2010 e janeiro e agosto em 2011 (Gráfico 1).

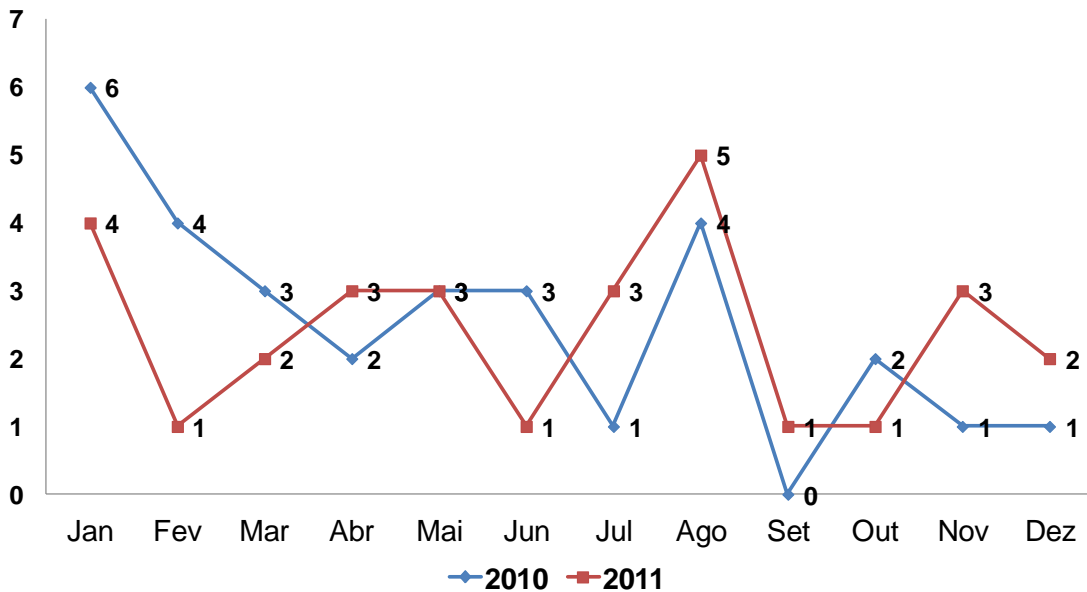


Gráfico 1: Número de casos de criptococose diagnosticados no HUIBB nos anos de 2010 e 2011.

A maioria dos pacientes era procedente do município de Belém com 23/59 (39%) dos casos, seguido pelos municípios de Ananindeua e Marituba, onde ambos apresentavam 5% (3/59) dos casos. Outros 20 municípios do Estado do Pará contribuíram com um ou dois casos (Gráfico 2). Neste estudo, os casos de criptococose ocorreram em 4 das 6 mesorregiões do Pará com maior ocorrência na região metropolitana de Belém (52,5%) e no Nordeste Paraense (33,9%) (Figura 13).

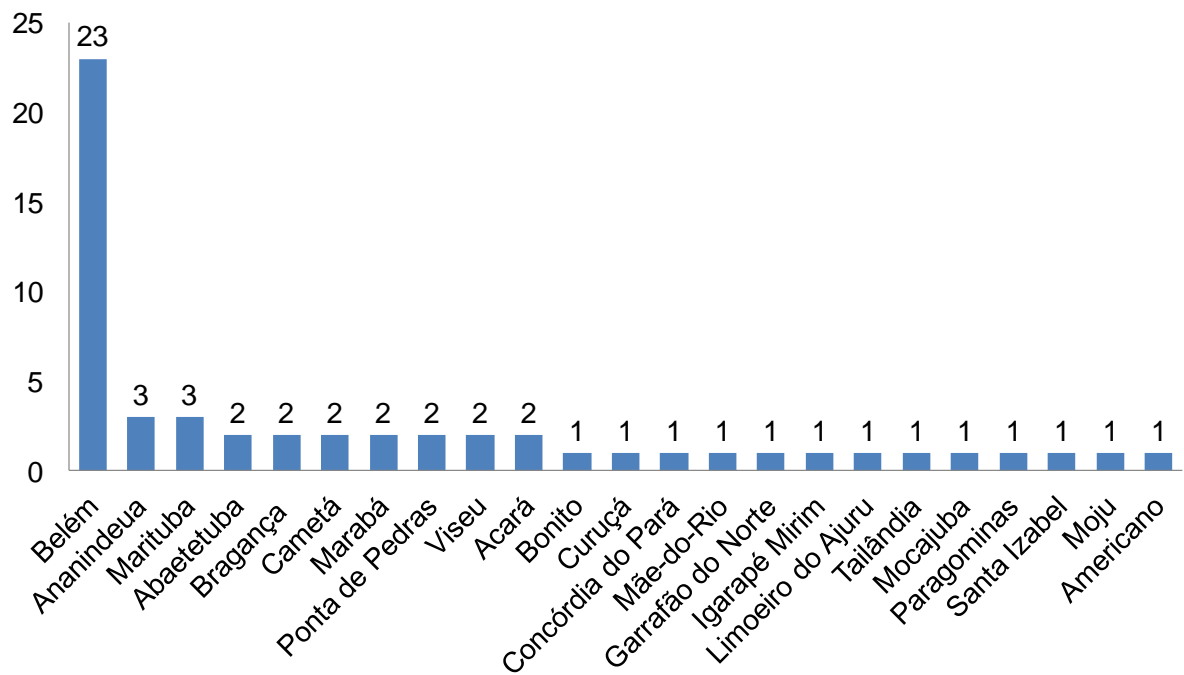


Gráfico 2: Distribuição dos casos de criptococose diagnosticados no HUIBB, no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2011.

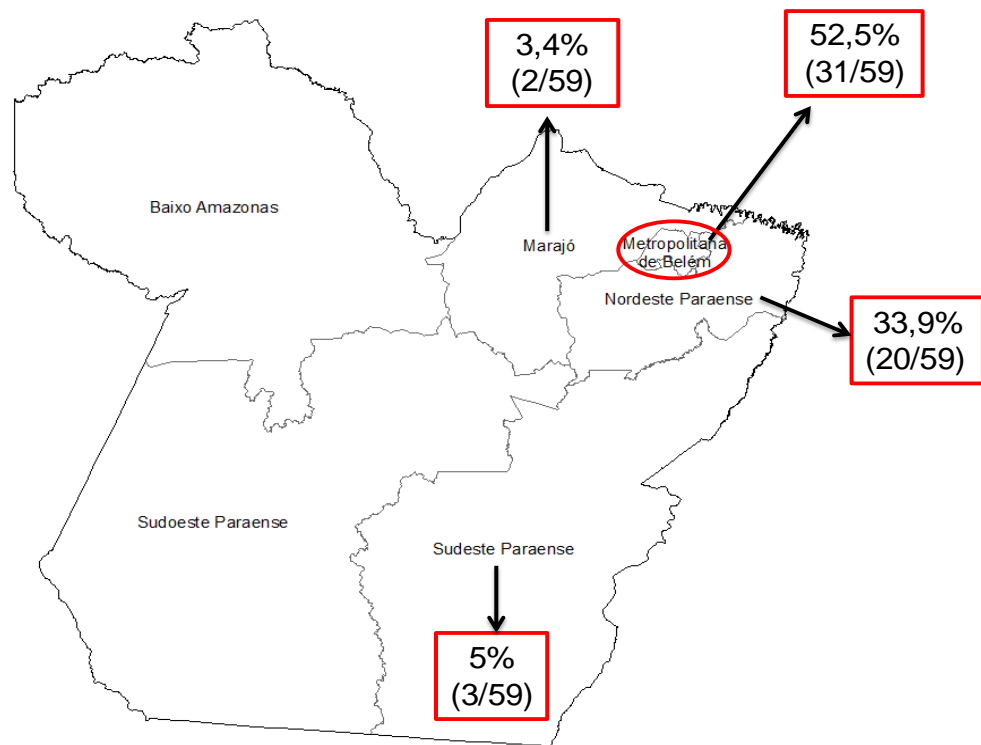


Figura 13: Distribuição dos casos de criptococose por mesorregiões do Pará.

A maioria dos pacientes era homens (36/59) com idade entre 5 a 70 anos (Gráfico 3).

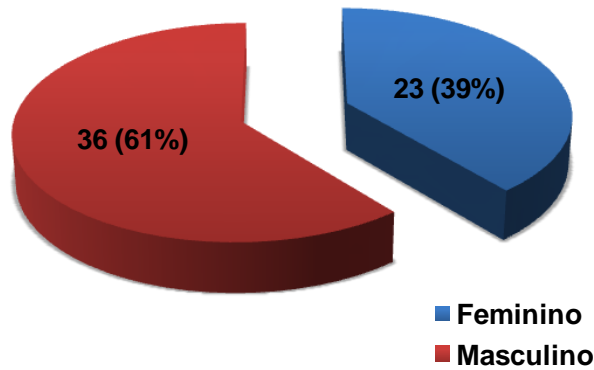


Gráfico 3: Distribuição dos casos de criptococose no HUUJBB nos anos de 2010 e 2011 por sexo.

A idade dos pacientes variou de 5 a 70 anos. Neste estudo foram evidenciados 7 casos (11,9%) de criptococose em crianças. A faixa etária que predominou foi de 34 a 43 anos constituindo 39% (n=23) dos casos, seguida por pacientes com idade entre 14 a 23 anos e entre 24 a 33 anos, ambas com 18,6% (n=11) dos casos (Gráfico 4).

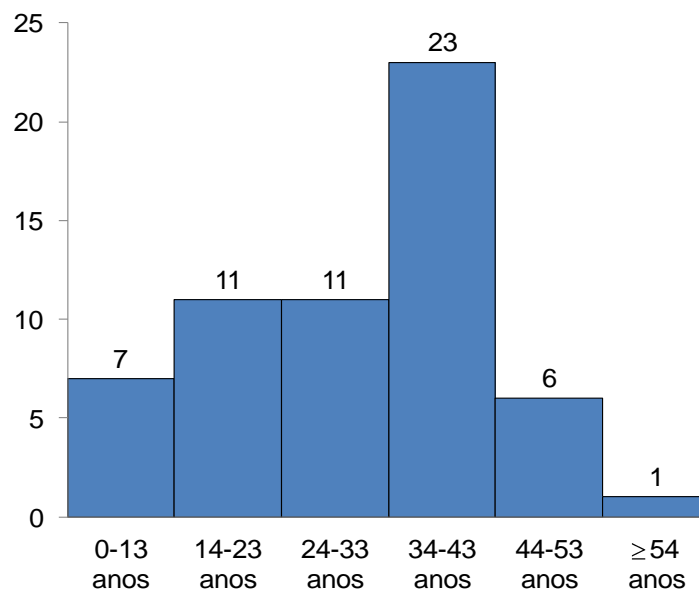


Gráfico 4: Distribuição dos casos de criptococose no HUUJBB nos anos de 2010 e 2011 por faixa etária.

Um total de 51 (86,4%) isolados do complexo *Cryptococcus spp.* foi analisado neste estudo. Destas cepas, 48 (94%) foram isoladas do LCR. Outros espécimes de onde o fungo foi isolado foram líquido broncoalveolar, secreção de abscesso na perna e líquido ascítico, com um isolado (2%) cada (Gráfico 5).

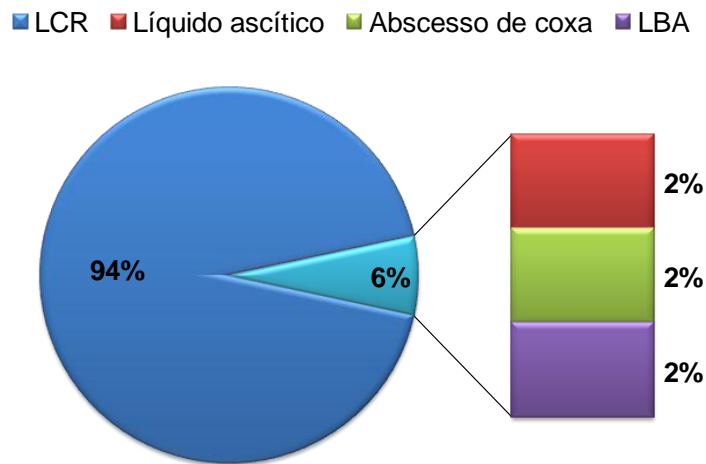


Gráfico 5: Material biológico em que os isolados de *Cryptococcus spp.* foram encontrados.

O tempo decorrido entre o início dos sintomas e diagnóstico de criptococose variou de 7 dias a 1 mês em 70,6% (36/51) dos pacientes e de mais de 1 mês a 1 ano em 29,4% (15/51) dos casos. Quando observado pelas espécies, é possível observar que a maioria dos casos de criptococose por *C. gattii* (16/19) e por *C. neoformans* (20/32) foi diagnosticada com menos de 31 dias após o início dos sintomas (Tabela 5). Não houve diferença significativamente estatística na distribuição de *C. gattii* e *C. neoformans* no intervalo entre o início dos sinais e sintomas e o diagnóstico da criptococose ($p=0,1233$).

Tabela 5: Intervalo entre o início dos sinais e sintomas e o diagnóstico da criptococose.

Intervalo entre o início dos sintomas e o diagnóstico	Espécie				Total		<i>p</i>
	<i>C. neoformans</i>		<i>C. gattii</i>		n	%	
	n	%	n	%			
7 ~ 31 dias	20	39,2	16	31,4	36	70,6	0,1233
Mais de 1 mês a 1 ano	12	23,5	3	5,9	15	29,4	
TOTAL	32	62,7	19	37,3	51	100%	

Os principais sinais e sintomas descritos no prontuário dos pacientes foram cefaleia (85,5%), vômito (80%) e febre (76,4%), seguidos por rigidez de nuca (45,5%), alteração de consciência (23,6%), convulsões (21,8%) e alteração visual (21,8%) (Gráfico 6).

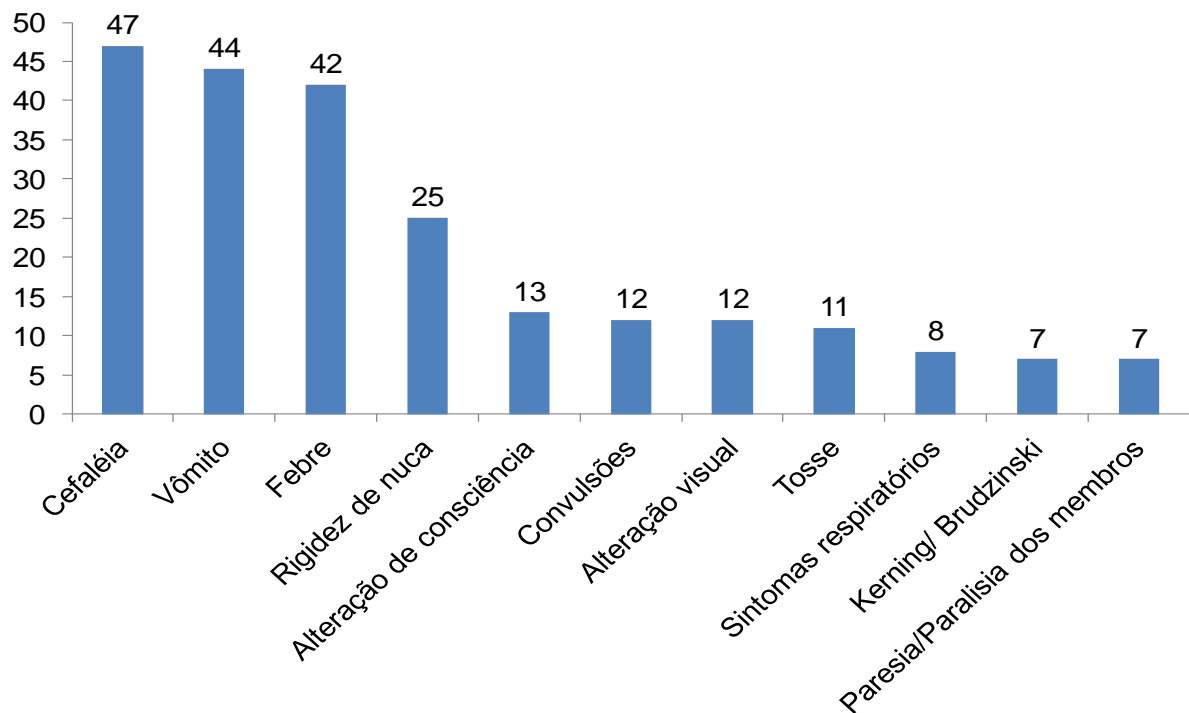


Gráfico 6: Principais sinais e sintomas apresentados pelos pacientes com criptococose.

Dentre os 59 casos ocorridos neste período, 51 foram isolados e caracterizados morfológica e bioquimicamente como pertencentes ao gênero *Cryptococcus*. Após a diferenciação das espécies, foram identificados 32 isolados (62,7%) como CGB negativo (*C. neoformans*) e 19 (37,3%), como CGB positivo (*C. gattii*).

Não houve diferença significativamente estatística do número de casos de *C. neoformans* e *C. gattii* entre homens e mulheres ($p=0,2242$). Todos os casos de criptococose causada por *C. neoformans* ocorreu em adultos ($p<0,0015$). Foram evidenciados sete casos em crianças, seis deles causados por *C. gattii* e em um caso não foi possível realizar a identificação da espécie. Já em adultos foram observados 13 casos de infecção por *C. gattii*, todos HIV negativos que residiam tanto na zona rural como na zona urbana. O número de casos de *C. neoformans* em pacientes que residiam em zona urbana foi significativamente mais alto do que aqueles que se encontravam em zona rural ($p=0,001$). Já entre os casos de HIV, não foi observado diferenças estatísticas entre as duas espécies ($p=0,1844$) (Tabela 6).

Tabela 6: Características dos pacientes com criptococose internados no HUIBB, Belém-PA nos anos de 2010 e 2011.

Características	Espécie				Total		p
	<i>C. neoformans</i>		<i>C. gattii</i>		n	%	
	n	%	n	%			
Sexo							
Masculino	22	43,1	9	17,7	31	60,8	0,2242
Feminino	10	19,6	10	19,6	20	39,2	
Idade (anos)							
Criança	0	0	6	11,8	6	11,8	0,0015
Adultos	32	62,7	13	25,5	45	88,2	
HIV							
Positivo	29	56,9	0	0	29	56,9	0,1844
Negativo	3	5,9	19	37,2	22	43,1	
Zona							
Urbana	30	58,8	10	19,6	40	78,4	0,001
Rural	2	3,9	9	17,7	11	21,6	

Todas as crianças, que apresentavam isolados com espécie identificada (6/6) eram HIV negativas, tendo como agente causador o *C. gattii*. Já entre os adultos, 71,1% (32/45) eram causados por *C. neoformans*, onde a maioria (29/45) era HIV positivo e somente três (5%) pacientes eram HIV negativos. Além disso, também ocorreram casos de criptococose por *C. gattii* entre adultos constituindo 28,9% (13/45) da amostra em questão (Tabela 7).

Tabela 7: Distribuição por faixa etária, espécie e infecção por HIV dos casos de criptococose no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2011.

Faixa etária	Espécie	HIV	Casos (%)
Criança ≤ 13 anos	<i>C. neoformans</i>	Positivo	0 (0%)
		Negativo	0 (0%)
	<i>C. gattii</i>	Positivo	0 (0%)
		Negativo	6 (100%)
Adultos > 13 anos	<i>C. neoformans</i>	Positivo	29 (64,4%)
		Negativo	3 (6,7%)
	<i>C. gattii</i>	Positivo	0 (0%)
		Negativo	13 (28,9%)

Dentre os 51 pacientes diagnosticados com criptococose, 14 (25, 9%) foram a óbito, sendo 16,7% (2/12) desses casos por *C. gattii* e 83,3% (10/12) por *C. neoformans*. As sequelas foram descritas em 76,9% (10/13) dos pacientes com *C. gattii* e em 23,1% (3/13) entre os casos de *C. neoformans*. As principais sequelas assinaladas foram diminuição da acuidade visual, alteração da marcha, amaurose, entre outros. Os casos de recidiva ocorreram tanto em pacientes infectados por *C. gattii* como por *C. neoformans*, sendo mais elevado nos casos de *C. neoformans* (Tabela 8). O risco relativo de o paciente ir a óbito e de apresentar recidiva não apresentou diferenças estatísticas significativas entre as duas espécies de *Cryptococcus*. No entanto, o risco relativo para sequelas foi significativamente mais elevado em pacientes infectados por *C. gattii* do que por *C. neoformans* ($p=0,001$).

Tabela 8: Casos de óbitos, sequelas e recidivas entre os pacientes infectados por *Cryptococcus spp.* no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2011.

		Espécie		<i>p</i>	RR (IC 95%)
		<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>		
		n	n		
Óbito					
	Sim	10	2	0,2242	2,97 (0,73-12,14)
	Não	22	17		
Sequela					
	Sim	3	10	0,001	0,18 (0,06-0,57)
	Não	29	9		
Recidiva					
	Sim	10	5	0,4776	1,19 (0,48-2,95)
	Não	22	14		

Apesar de 51 amostras terem sido isoladas e diferenciadas, devido a contaminações, apenas 45 foram submetidas a análise molecular. Quanto ao tipo sexuado, todos os 45 isolados clínicos foram estudados utilizando iniciadores específicos para determinação de MAT α e MAT a, que amplificavam fragmentos de 101 bp e 117 bp, respectivamente. Todos os isolados revelaram-se ser MAT α (Figura 14).

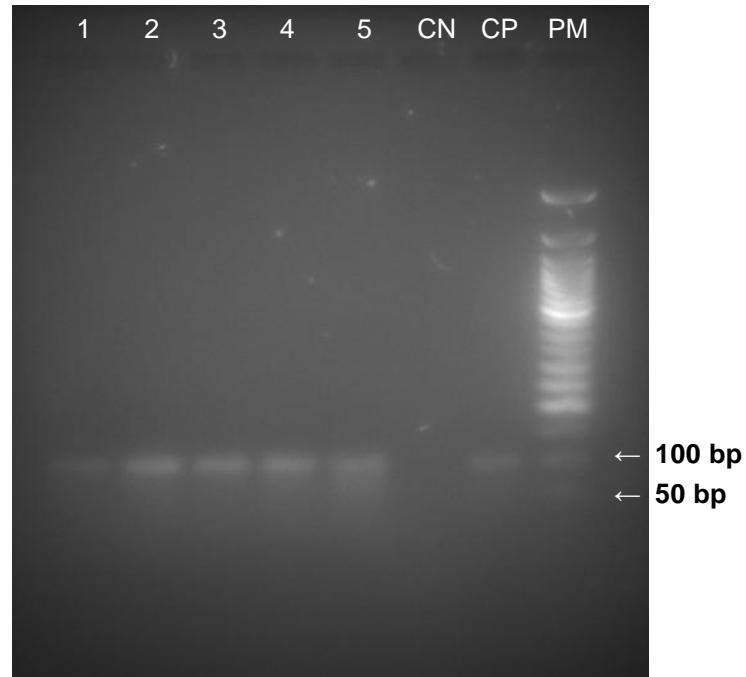


Figura 14: Gel de agarose evidenciando produto de PCR para tipo sexuado de *Cryptococcus spp.* 1-5: Isolados clínicos. CN: Controle Negativo. CP: Controle Positivo. PM: Peso Molecular 50 bp (Biolabs).

Para diferenciação entre os tipos moleculares foi realizada uma PCR para amplificação do gene *URA5*, que amplificou fragmento de 750 pb (Figura 11). Após realização da RFLP, os perfis moleculares obtidos mostraram dois dos oito padrões descritos: VNI, correspondente a *C. neoformans* e VGII, correspondente a *C. gattii* (Figura 15 e 16).

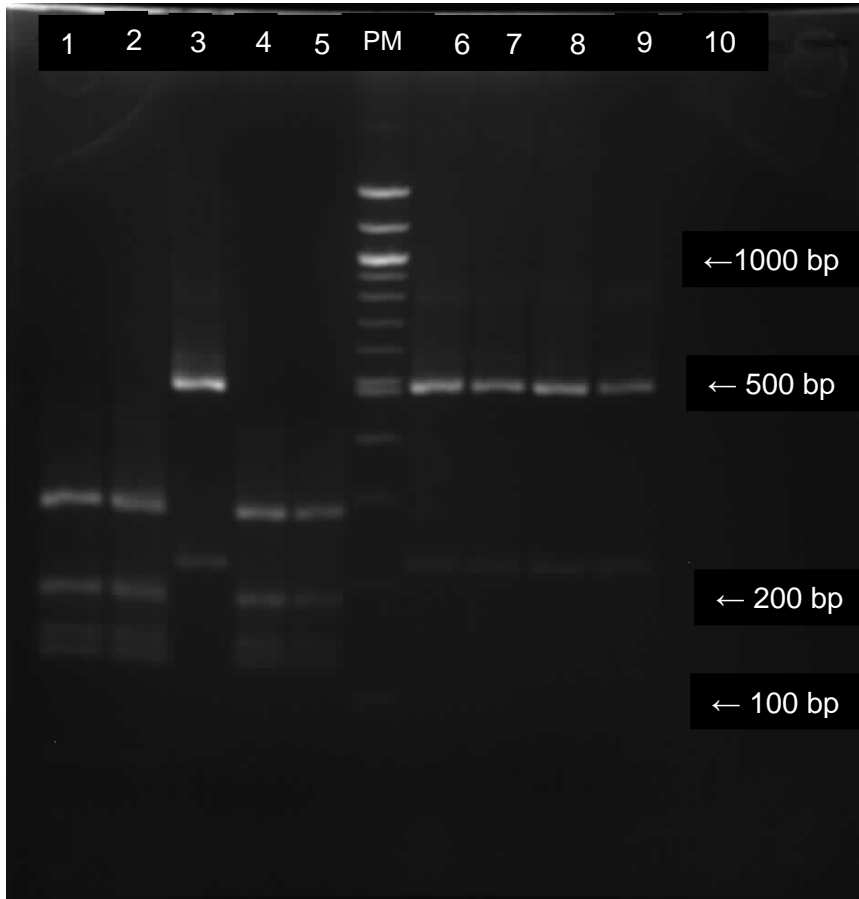


Figura 15: Gel de agarose evidenciado produto de PCR utilizando a técnica de RFLP duplamente digerido com *Sau96I* e *HhaI*. 1-2;5-9: Isolados clínicos. 3: genótipo VNI. 4: genótipo VGII. PM: Peso Molecular 100 pb (Biolabs).

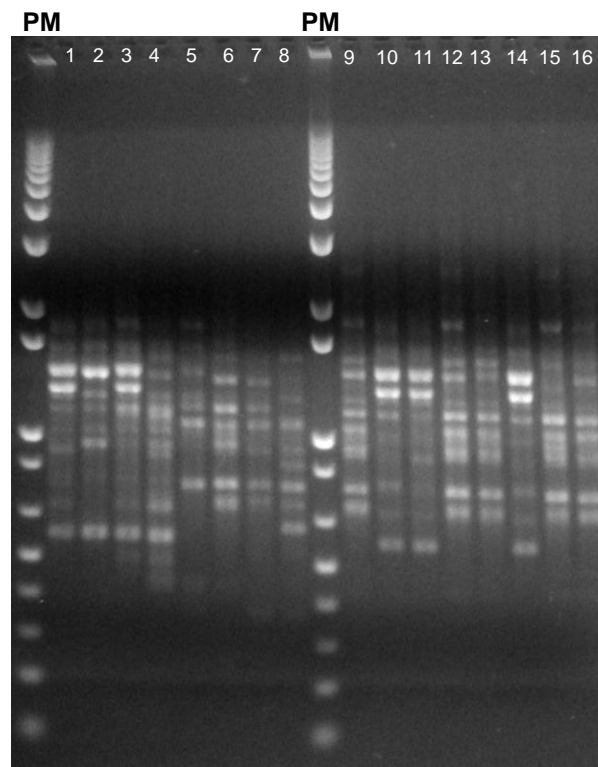


Figura 16: Gel de agarose evidenciando os tipos moleculares do *Cryptococcus spp.* através da técnica de PCR *fingerprint* (M13). 1-4: Cepa padrão VNI-VNIV, respectivamente. 5-8: Cepa padrão VGI-VGIV, respectivamente. 9-16: Isolados clínicos de *Cryptococcus*. PM: Peso Molecular 1 kb (Invitrogen).

A tipagem molecular mostrou que dos 45 pacientes, 29 estavam infectados pelo genótipo VNI correspondente ao *C. neoformans var. grubii* e 16 pelo genótipo VGII correspondente ao *C. gattii* (Gráfico 7).

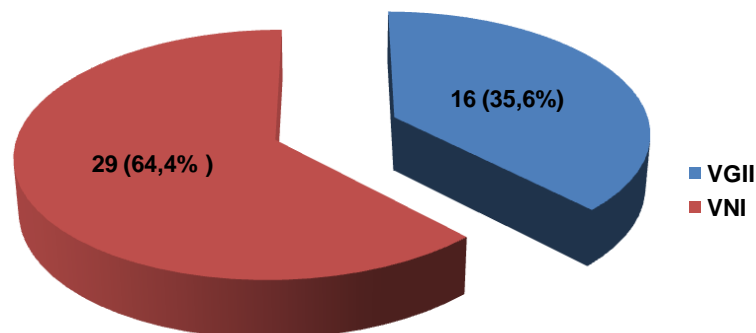


Gráfico 7: Genótipos dos 45 isolados clínicos de *Cryptococcus*.

8 DISCUSSÃO

Antes da pandemia de aids, a criptococose era uma infecção fúngica sistêmica incomum associada principalmente a pacientes com a imunidade comprometida. Atualmente, no mundo, a criptococose é causada principalmente pelo *C. neoformans* do genótipo VNI, atingindo especialmente os pacientes com aids. De fato, a criptococose é a micose sistêmica frequentemente encontrada em pacientes HIV positivos, sendo responsável por uma maior proporção de óbitos (RIBEIRO et al., 2009).

A análise dos dados deste estudo aponta o registro de 59 casos de criptococose oriundos de 23 dos 144 municípios do estado do Pará, concentrando-se principalmente na região metropolitana de Belém. Além disso, neste estudo não foi evidenciado casos de criptococose em duas mesorregiões do estado (Baixo Amazonas e Sudoeste Paraense), provavelmente pela distância e difícil acesso ao Hospital Universitário João de Barros Barreto, centro de referência em doenças infecto-parasitárias no estado do Pará.

As infecções causadas por *C. neoformans* e *C. gattii* ocorrem predominantemente entre homens. É possível que a explicação para este fato esteja relacionada aos hormônios femininos, pois Lortholary et al. (2002) demonstraram em camundongos, que as fêmeas apresentavam a expressão de todas as citocinas no plasma e de TNF- α e IFN- γ no fígado, significativamente mais elevada quando comparado aos camundongos machos.

Um estudo prospectivo na Austrália no período de 1994-1997 mostrou que os homens eram mais comumente afetados pela criptococose do que as mulheres (CHEN et al., 2000). Outro estudo envolvendo 15 laboratórios de 9 países Iberoamericanos, apresentou resultados semelhantes, onde taxa de criptococose foi 5,1 vezes mais alta em homens do que em mulheres (MEYER et al., 2003). Essa predominância também foi observada na Espanha, por Colom et al. (2001), e na Malásia, por Tay et al. (2009), onde 88,4% e 77,1% dos pacientes, respectivamente, eram homens. Esses dados corroboram com os resultados deste estudo, já que a maioria dos infectados eram homens com idade entre 34 a 43 anos. Na Espanha, as maiores frequências foram observadas entre 30 e 40 anos (COLOM et al., 2001). Estes dados corroboram com os resultados obtidos neste estudo, onde a maior parte dos infectados eram homens com idade entre 34 a 43 anos.

A meningite criptocócica foi a forma clínica mais frequente. No entanto, o *Cryptococcus spp.* também foi isolado de outros espécimes clínicos como líquido broncoalveolar, líquido ascítico e de abscesso de coxa. Assim como neste estudo, a meningoencefalite é a forma clínica mais observada tanto no exterior (COLOM et al., 2001; JENNEY et al., 2004; JONGWUTIWES et al., 2008; TAY et al., 2009) como em cidades do Brasil (CORREA et al., 1999; MOREIRA et al., 2006; SANTOS, 2008).

No presente estudo, o *Cryptococcus spp.* foi isolado em uma amostra de lesão de pele de uma paciente HIV negativa residente da área urbana de Belém. O isolado foi submetido à cultura, testes bioquímicos e moleculares para identificação da espécie. Foi identificado como *Cryptococcus neoformans* do genótipo VNI. Em geral, a infecção cutânea pode ser adquirida pela inalação de partículas infectantes com disseminação hematogênica ou em raros casos pela inoculação direta na pele chamada de criptococose cutânea primária (BIVANCO et al., 2006). A criptococose cutânea evidencia a presença de doença disseminada, principalmente em pacientes imunocomprometidos e raramente é relatada em pacientes imunocompetentes (LINGEGOWDA et al., 2011).

Em um estudo realizado por Jenney et al. (2004), o tempo decorrido entre o início dos sintomas e o diagnóstico foi de 1 dia a 3 meses. Já no estudo de Correa et al. (1999) esse tempo foi de 3 dias a 4 semanas. O resultado obtido nesse estudo foi semelhante, onde na maioria dos casos, esse intervalo foi de 7 dias a 1 mês. Os principais sintomas observados neste estudo foram dor de cabeça e febre, semelhante aos resultados obtidos por outros estudos (CORREA et al., 1999; DARZE et al., 2000; LEAL, 2006; RIBEIRO, 2006; TROMBETTA & BAVA, 2008). Sintomas mais específicos e associados a quadro de meningite, como rigidez de nuca, ocorreram em menor proporção.

A determinação das espécies foi realizada através do meio CGB, método clássico e de baixo custo que foi proposto em 1982. Essa diferenciação ocorre porque somente o *C. gattii* é resistente a canavalina e possui a habilidade de utilizar a glicina como única fonte de carbono e nitrogênio, liberando amônia e modificando o pH do meio, tornando-o mais básico promovendo assim a mudança de coloração do meio de sua cor inicial, amarelo-esverdeado, para o azul caracterizando reação positiva para *C. gattii*. A presença de resultados duvidosos tem levado os pesquisadores a buscar novos métodos que permitam a identificação exata da espécie de *Cryptococcus spp.* Nesse estudo, todos os isolados submetidos ao

cultivo pelo meio CGB concordaram com os resultados obtidos pelo RFLP, corroborando com os dados obtidos no estudo realizado por Matsumoto (2006). Resultados diferentes foram obtidos no estudo realizado por Leal et al. (2008), onde 6 das 131 amostras submetidos ao CGB apresentaram resultados diferentes.

O *C. neoformans* é cosmopolita, associado principalmente a pacientes imunocomprometidos sendo descrito como principal agente etiológico da criptococose em países da Europa, da América Latina e da Ásia (CHAU et al., 2010; MEYER et al., 2003; VIVIANI et al., 2006). No Brasil, esta espécie também é a mais encontrada, sendo a mais frequente no Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul, Goiânia e São Paulo (ALMEIDA et al., 2007; FAVALESSA et al., 2009; LEAL et al., 2008; LINDENBERG et al., 2008; NISHIKAWA et al., 2003; SOUZA et al., 2009; TRILLES et al., 2008). Assim como observados nos estudos citados acima, nesse trabalho a espécie *C. neoformans* foi a mais encontrada estando associada principalmente a pacientes HIV positivos.

Diferente do que se observa nas demais regiões do Brasil, as regiões Norte e Nordeste apresentam uma elevada frequência de criptococose causada por *C. gattii* (CAVALCANTI, 1995; CORREA et al., 1999; SANTOS, 2008). Esta espécie é considerada patógeno primário em pacientes imunocompetentes, apresentando-se como uma espécie mais virulenta, de difícil tratamento (SPEED & DUNT, 1995).

As infecções causadas por *C. gattii* foram frequentes nesse estudo, representando 35,2% dos casos de criptococose, ressaltando que estado do Pará constitui uma região de elevada endemicidade para esta espécie. Nesse estudo, apesar desta espécie não ter sido a maior responsável pelos óbitos, as infecções causadas por *C. gattii* foram as que apresentaram o maior número de sequelas.

Embora seja pouco evidenciada na literatura, a incidência da criptococose no estado Pará é relativamente alta, com elevadas taxas de infecção principalmente entre crianças aparentemente imunocompetentes. Correa et al. (1999) mostraram em seu estudo que dos 78 pacientes internados com criptococose, 19 eram crianças menores de 13 anos, que apresentavam doença com envolvimento do SNC. Destas crianças, cinco ficaram cegas e seis foram a óbito. Na literatura mundial, casuísticas envolvendo crianças são raras ou pouco frequentes, estando ou não associada a aids.

Vários estudos vêm demonstrando que o estado Pará constitui uma região de elevada endemicidade de criptococose causada pelo *C. gattii* (CORREA et al., 1999;

COSTA, 2008; SANTOS, 2008). Santos (2008) realizou um estudo em um hospital de referência para doenças infecciosas e parasitárias no Estado do Pará e mostrou que no período de 1980 a 2007 ocorreram 142 casos de criptococose, onde 32 deles eram em crianças menores de 13 anos. Todas as crianças deste estudo eram HIV negativas e tinham como agente etiológico o *C. gattii*.

Similar a outros estudos, a maior parte dos casos de criptococose residiam em zona urbana, reforçando a ideia de que esse fungo está bem adaptado às cidades. O grande número de pombos presentes em residências e praças públicas pode ser uma condição favorável a essa adaptação.

Jongwutiwes et al. (2008) realizaram um estudo na Tailândia de 1996 a 2005 envolvendo 178 pacientes diagnosticados com infecção criptocócica. Destes, 83,7% (n=149) eram HIV positivo, a maioria com envolvimento do SNC. Escosteguy et al. (2004) analisaram 694 casos confirmados de meningite, onde 12,3% eram causados por *Cryptococcus spp.*, com 37,7% de letalidade, sendo a maioria pacientes com aids.

A letalidade em pacientes com criptococose é elevada podendo variar de 22,2% a 75,3% (CORREA et al., 1999; ESCOSTEGUY et al., 2004; JONGWUTIWES et al., 2008; LEIMANN & KOIFMAN, 2008; LINDENBERG et al., 2008; MOREIRA et al., 2006). Neste estudo, assim como é evidenciado pela literatura mundial, o número de óbitos foi de 25,9%, ocorrendo principalmente em pacientes infectados por *C. neoformans*.

A infecção causada pelo *C. gattii* apresenta diferenças nas manifestações clínicas como a presença significativa de massas inflamatórias (criptococomas) que podem produzir sequelas neurológicas. Neste estudo, o número de sequelas foi significativamente mais alto em pacientes infectados pelo *C. gattii*, concordando com dados da literatura mundial (CHEN et al., 2000; SPEED & DUNT, 1995).

Atualmente são reconhecidos dois tipos sexuados de *Cryptococcus spp.*: MAT a e MAT α , que apresentam um importante papel na virulência desse fungo. O MAT α é 30 a 40 vezes mais frequente do que o MAT a, além de ser mais virulento (CASADEVALL & PERFECT, 1998; CASALI et al., 2003; KWON-CHUNG & BENNETT, 1978; SPRINGER & CHATURVEDI, 2010). Kwon-Chung et al. (1992) mostraram em seu estudo que o MAT α era claramente mais virulento que o MAT a, ao observar que os camundongos infectados com cepas α morriam bem mais cedo do que aqueles infectados pela cepa a. Um estudo conduzido por Nielsen et al.

(2005) demonstrou uma predileção das células α em penetrar no SNC de ratos coinfetados com cepas MAT a e MAT α , mesmo essas cepas sendo equivalentes em tecidos periféricos. Neste estudo, a determinação do tipo sexuado mostrou que 100% das cepas eram MAT α concordando com resultados obtidos por outros autores que demonstraram sua elevada frequência tanto em isolados clínicos como ambientais (ANDRADE-SILVA et al., 2010; CASALI et al., 2003; SANTOS, 2008; SPRINGER & CHATURVEDI, 2010).

Várias técnicas moleculares, como RFLP, PCR fingerprint e o RAPD, vêm sendo utilizadas para identificar os tipos moleculares de *Cryptococcus spp.* e demonstrar a variabilidade genética dos isolados contribuindo para um melhor entendimento da epidemiologia doença (ALMEIDA et al., 2007; ANDRADE-SILVA et al., 2010; CHEN et al., 2000; FERREIRA-PAIM et al., 2010; FRASES et al., 2009; MARTINS et al., 2007; MEYER et al., 1999; MEYER et al., 2003; SOUZA et al., 2009).

A pesquisa em países Iberoamericanos mostrou que a maioria dos isolados era VNI (*C. neoformans* var. *grubii*), com exceção da Espanha, onde o genótipo predominante foi o VNIII. No Brasil, há um predomínio dos genótipos VNI, seguidos pelos genótipos VGII e VNI (MEYER et al., 2003). Esses dados concordam com os resultados obtidos nesse estudo, onde foi detectada apenas a presença do genótipo VNI e VGII.

O genótipo VNI predominou dentre os isolados de *C. neoformans* (100%) como demonstrado por outros autores (ANDRADE-SILVA et al., 2010). Dentre os isolados de *C. gattii*, todos pertenciam ao genótipo VGII. Este tipo molecular foi o responsável por um surto no Canadá que atingiu homens, animais silvestres e domésticos (KIDD et al., 2004).

Trilles et al. (2008) analisou 443 isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* para determinar a distribuição geográfica no Brasil. Através de PCR *fingerprint*, RFLP e AFLP foram identificados os oito genótipos, sendo o mais comum o VNI correspondendo a 64% dos isolados, seguido pelo VGII (21%), VNII (5%), VGIII (4%), VGI e VGIV (3% cada) e VNIII (menos de 1%). Além disso, é ressaltado que o VGII é prevalente em hospedeiros aparentemente imunocompetentes nas regiões Norte e Nordeste.

Dados semelhantes foram encontrados no estudo de Santos (2008) que evidenciou a presença dos genótipos VGII, predominantemente associado a

hospedeiros HIV negativo, e VNI, principalmente associado a aids no estado do Pará.

Investigações ambientais também são extremamente importantes para se conhecer as cepas circulantes em cada região, além de determinar novas fontes de infecção. Costa (2008) registrou pela primeira vez a ocorrência de *C. neoformans*, genótipo VNI em fezes de pombos e de *C. neoformans*, genótipo VNI e *C. gattii*, genótipo VGII compartilhando o mesmo oco de árvore na cidade de Belém. Além disso, a maioria dos isolados obtidos foi de poeira doméstica, evidenciando a presença deste fungo dentro da residência do paciente.

9 CONCLUSÃO

- A criptococose ocorreu principalmente entre pacientes adultos provenientes da zona urbana de Belém;
- A maioria dos casos de criptococose foi na forma de meningoencefalite, tendo como sinais e sintomas mais observados cefaleia, vômito, febre e rigidez de nuca;
- Os casos de criptococose foram causados tanto por *C. neoformans* como por *C. gattii*, diagnosticados 7 a 31 dias após o início dos sinais e sintomas;
- A criptococose infantil ocorre no Pará, principalmente associada a pacientes HIV negativo, constituindo uma casuística diferente da observada no mundo;
- Todas as crianças deste estudo eram não associadas ao HIV e foram infectadas por *C. gattii* do genótipo VGII;
- A criptococose em adultos ocorreu principalmente em pacientes HIV positivo infectados por *C. neoformans*;
- Os casos de óbito e de recidivas foram mais elevados entre os pacientes infectados por *C. neoformans*;
- Neste estudo, os pacientes infectados por *C. gattii* tiveram mais sequelas do que aqueles em que o agente era *C. neoformans*;
- MAT α foi o tipo sexuado identificado entre os isolados estudados;
- Houve a predominância de dois tipos moleculares: VNI (64,4%) e VGII (35,6%);

10 PERSPECTIVAS

Estudos moleculares adicionais são necessários visando caracterizar detalhadamente os genótipos presentes em nossa região a fim de possibilitar a descoberta de novas fontes ambientais e formas de controle dessa infecção. A meningite criptocócica causada por *C. gattii* tem sido registrada em nossa região notadamente infectando crianças e adultos jovens aparentemente hígidos, normalmente com envolvimento do SNC. Além disso, a realização de um estudo comparativo mais aprofundado sobre os isolados encontrados no paciente e em sua residência são de grande importância para se conhecer a eco-epidemiologia deste fungo. Para tanto, torna-se fundamental o conhecimento das cepas circulantes e sua correlação com os dados clínicos e epidemiológicos para se ter um melhor conhecimento sobre a criptococose no estado do Pará.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.M.F.; MATSUMOTO, M.T.; BAEZA, L.C.; SILVA, R.B.O.; 1,2,4, KLEINER, A.A.P.; 3, MELHEM, M.S.C.; GIANNINI, M.J.S.M.; THE LABORATORY GROUP ON CRYPTOCOCCOSIS. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical sequential isolates of *Cryptococcus neoformans* from Sao Paulo State, Brazil. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 7, p. 152-164, 2007.

ALVARADO-RAMÍREZ, E.; TORRES-RODRÍGUES, J.M.; SELLART, M.; VIDOTTO, V. Laccase activity in *Cryptococcus gatti* strains isolated from goats. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, p. 150-153, 2008.

ANAISSIE, E.J.; BODEY, G.P.; RINALDI, M.G. Emerging fungal pathogens. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 8, p. 323-330, 1989.

ANDRADE-SILVA, L.; FERREIRA-PAIM, K.; SILVA-VERGARA, M.L.; PEDROSA, A.L. Molecular characterization and evaluation of virulence factors of *Cryptococcus laurentii* and *Cryptococcus neoformans* strains isolated from external hospital areas. **Fungal Biology**, v. 114, p. 438-445, 2010.

BAKER, R.D.; HAUGEN, R.K. Tissue changes and tissue diagnosis in cryptococcosis: a study of twenty-six cases. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 25, p. 14-24, 1955.

BAKER, D.J.; REBOLI, A.C. Images in clinical medicine: Cutaneous cryptococcosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 336, p. 998, 1997.

BANERJEE, U.; DATTA, K.; CASADEVALL, A. Serotype distribution of *Cryptococcus neoformans* in patients in a tertiary care center in India. **Medical Mycology**, v. 42, p. 181-186, 2004.

BARNETT, J.A. A history of research on yeasts 14: medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. **Yeast**, v. 27, p. 875-904, 2010.

BARÓ, T.; TORRES-RODRÍGUEZ, J.M.; MORERA, Y.; ALÍA, C.; LÓPEZ, O.; MÉNDEZ, R. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 1170-1172, 1999.

BAUWENS, L.; VERCAMMEN, F.; WUYTACK, C.; VAN LOOVEREN, K.; SWINNE, D. Isolation of *Cryptococcus neoformans* in Antwerp Zoo's nocturnal house. **Mycoses**, v. 47, p. 292-296, 2004.

BAVA, A.J.; ROBLES, A.M.; NEGRONI, R.; ARECHAVALA, A.; BIANCHI, M. Estudio de algunos aspectos epidemiológicos de 253 casos de criptococosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 14, p. 111-114, 1997.

BENNETT, J.E.; KWON-CHUNG, K.J.; HOWARD, D.H. Epidemiologic differences among serotypes of *Cryptococcus neoformans*. **American Journal of Epidemiology**, v. 105, p. 582-586, 1977.

BHATTACHARJEE, A.K.; BENNETT, J.E.; GLAUDEMANS, C.P.J. Capsular Polysaccharides of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 6, p. 619-624, 1984.

BICANIC, T.; HARRISON, T.; NIEPIEKLO, A.; DYAKOPU, N.; MEINTJES, G. Symptomatic relapse of HIV-associated cryptococcal meningitis after initial fluconazol monotherapy: the role of fluconazole resistance and immune reconstitution. **Clinical of Infectious Diseases**, v. 43, p. 1069-1073, 2006.

BIVANCO, F.C.; MACHADO, C.A.S.; MARTINS, E.L. Criptococose cutânea. **Arquivos Médicos do ABC**, v. 31, 102-109, 2006.

BLACKSTOCK, R.; BUCHANAN, K.L.; MITCHELL, T.G.; WONG, B.; BARTISS, A.; JACKSON, L.; MURPHY, J.W. Pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* is associated with quantitative differences in multiple virulence factors. **Myopathologia**, v. 147, p. 1-11, 1999.

BODASING, N.; SEATON, R.A.; SHANKLAND, G.S.; KENNEDY, D. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* meningitis in an HIV-positive patient: first observation in the United Kingdom. **Journal of Infection**, v. 49, p. 253-255, 2004

BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; DIAZ, M.; FELL, J.W.; HOP, W.C.J.; ABELN, E.C.A.; DROMER, F.; MEYER, W. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 147, p. 891-907, 2001.

BOSE, I.; REESE, A.J.; ORY, J.J.; JANBON, G.; DOERING, T.L. A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 2, p. 655-663, 2003.

BROUWER, A.E.; VAN KAN, H.J.; JOHNSON, E.; RAJANUWONG, A.; TEPARRUKKUL, P.; WUTHIEKANUN, V.; CHIERAKUL, W.; DAY, N.; HARRISON, T.S. Oral versus intravenous flucytosine in patients with human immunodeficiency virus-associated cryptococcal meningitis. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 51, p. 1038-1042, 2007.

BUCHANAN, K.L.; MURPHY, J.W. What Makes *Cryptococcus neoformans* a Pathogen?. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, p. 71-83, 1998.

BULMER, G.S.; SANS, M.D. *Cryptococcus neoformans*. III. Inhibition of phagocytosis. **Journal of Bacteriology**, v. 95, p. 5-8, 1968.

BUTLER, W.T.; ALLING, D.W.; SPICKARD, A.; UTZ, J.P. Diagnostic and Prognostic Value of Clinical and Laboratory Findings in Cryptococcal Meningitis — A Follow-up Study of Forty Patients. **The New England Journal of Medicine**, v. 270, p. 59-67, 1964.

CALLEJAS, A.; ORDOÑEZ, N.; RODRIGUEZ, M.C.; CASTAÑEDA, E. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, from the environment in Colombia. **Medical Mycology**, v. 36, p. 341-344, 1998.

CAMERON, M.J.; BARTLETT, J.A.; GALLIS, H.A.; WASKIN, H.A. Manifestations of pulmonary cryptococcosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 13, p. 64-67, 1991.

CASADEVALL, S. Cryptococci at the brain gate: break and enter or use a Trojan horse? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, p. 1389-1392, 2010.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J.R. ***Cryptococcus neoformans***. Washington: American Society for Microbiology, 1998. 547pp.

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

CAVALCANTI, M.A.S. **Criptococose e seu agente etiológico no Meio Norte, Estados do Piauí e Maranhão, Brasil**. 1995. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária). Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro.

CHAKRABARTI, A.; JATANA, M.; KUMAR, P.; CHATHA, L.; KAUSHAL, A.; PADHYE, A.A. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus camaldulensis* in India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 3340-3342, 1997.

CHANG, Y.C.; KWON-CHUNG, K.J. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, p. 4912-4919, 1994.

CHANG, Y.C.; KWON-CHUNG, K.J. Isolation of the third capsule-associated gene, *CAP60*, required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 2230-2236, 1998.

CHANG, Y.C.; KWON-CHUNG, K.J. Isolation, characterization, and localization of a capsule-associated gene, *CAP10*, of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 5636-5643, 1999.

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

CHANG, Y.C.; STINS, M.F.; MCCAFFERY, M.J.; MILLER, G.F.; PARE, D.R.; DAM, T.; PAUL-SATYASEE, M.; KIM, K.S.; KWON-CHUNG, K.J. Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 4985-4995, 2004.

CHARLIER, C.; NIELSEN, K.; DAOU, S.; BRIGITTE, M.; CHRETIEN, F.; DROMER, F. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 77, p. 120-127, 2009.

CHATURVEDI, S.; RODEGHIER, B.; FAN, J.; MCCLELLAND, C.M.; WICKES, B.L.; CHATURVEDI, V. Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* MAT α and MATa pheromones to determine mating type, ploidy, and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 2007-2009, 2000.

CHAU, T.T.H.; MAI, N.H.; PHU, N.H.; NGHIA, H.D.; CHUONG, L.V.; SINH, D.X.; DUONG, V.A.; DIEP, P.T.; CAMPBELL, J.I.; BAKER, S.; HIEN, T.T.; LALLOO, D.G.; FARRAR, J.J.; DAY, J.N. A prospective descriptive study of cryptococcal meningitis in HIV uninfected patients in Vietnam - high prevalence of *Cryptococcus neoformans* var *grubii* in the absence of underlying disease. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, p. 1-8, 2010.

CHARIYALERTSAK, S.; SIRISANTHANA, T.; SAENGWONLOEY, O.; NELSON, K. Clinical presentation and risk behaviors of patients with acquired immunodeficiency syndrome in Thailand, 1994–1998: Regional variation and temporal trends. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 955-962, 2001.

CHAYAKULKEEREE, M.; PERFECT, J.R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 20, p. 507-544, 2006.

CHEN, J.; VARMA, A.; DIAZ, M.R.; LITVINTSEVA, A.P.; WOLLENBERG, K.K.; KWON-CHUNG, K.J. *Cryptococcus neoformans* strains and infection in apparently

immunocompetent patients, China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p. 755-762, 2008.

CHEN, S.; Sorrell, T.; Nimmo, G.; Speed, B.; Currie, B.; Ellis, D.; Marriott, D.; Pfeiffer, T.; Parr, D.; Byth, K.; Australasian Cryptococcal Study Group. Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, p. 499-508, 2000.

CHRISTOPH, I. Pulmonary *Cryptococcus neoformans* and disseminated *Nocardia brasiliensis* in an immunocompromised host: case report. **North Carolina Medical Journal**, v. 51, p. 219-220, 1990.

CHUCK, S.L.; SANDE, M.A. Infections with *Cryptococcus neoformans* in the acquired immunodeficiency syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v. 321, p. 794-799, 1989.

CLARK, J.M.; WHITNEY, R.R.; OLSEN, S.J.; GEORGE, R.J.; SWERDEL, M.R.; KUNSELMAN, L.; BONNER, D.P. Amphotericin B lipid complex therapy of experimental fungal infections in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, p. 615-621, 1991.

COGLIATI, M.; CHANDRASHEKAR, N.; ESPOSTO, M.C.; CHANDRAMUKI, A.; PETRINI, B.; VIVIANI, M.A. *Cryptococcus gattii* serotype-C strains isolated in Bangalore, Karnataka, India. **Mycoses**, v. 54, p. 1-7, 2011.

COKER, R.J.; VIVIANI, M.; GAZZARD, B.G.; DU PONT, B.; POHLE, H.D.; MURPHY, S.M.; ATOUGUIA, J.; CHAMPALIMAUD, J.L.; HARRIS, J.R. Treatment of cryptococcosis with liposomal amphotericin B (AmBisome) in 23 patients with AIDS. **AIDS**, v. 7, p. 829-835, 1993.

COLOM, M.F.; FRASÉS, S.; FERRER, C.; MARTÍN-MAZUELOS, E.; HERMOSO-DE-MENDOZA, M.; TORRES-RODRÍGUEZ, J.M.; QUINDÓS, G. Estudio epidemiológico de la criptococosis en España: primeros resultados. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 18, p. 99-104, 2001.

CORRÊA, M.P.S.C.; OLIVEIRA, E.C.; DUARTE, R.R.B.S.; PARDAL, P.P.O.; OLIVEIRA, F.M.; SEVERO, L.C. Criptococose em crianças no Estado do Pará, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, p. 505-508, 1999.

CORRÊA, M.P.S.C.; SEVERO, L.C.; OLIVEIRA, F.M.; IRION, K.; LONDERO, A.T. The spectrum of computerized tomography (CT) findings in central nervous system (CNS) infection due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in immunocompetent

children. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, p. 283-287, 2002.

COSTA, S.P.S.E. **Isolamento e caracterização molecular de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* de fontes ambientais na região metropolitana de Belém, Pará**. 2008. 180f. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária). Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro.

COX, G.M.; MCDADE, H.C.; CHEN, S.C.A.; TUCKER, S.C.; GOTTFREDSSON, M.; WRIGHT, L.C.; SORRELL, T.C.; LEIDICH, S.D.; CASADEVALL, A.; GHANNOUM, M.A.; PERFECT, J.R. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v. 39, p. 166-175, 2001.

COX, G.M.; MUKHERJEE, J.; COLE, G.T.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J.R. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 443-448, 2000.

DARZÉ, C.; LUCENA, R.; GOMES, I.; MELO, I. Características clínicas laboratoriais de 104 casos de meningoencefalite criptocócica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, p. 21-26, 2000.

DE VROEY, C.; GATTI, F. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* Vanbreuseghem and Takashio, 1970. **Mycoses**, v. 32, p. 675, 1989.

DELGADO, A.C.N.; TAGUCHI, H.; MIKAMI, Y.; MYIAJY, M.; VILLARES, M.C.; MORETTI, M.L. Human cryptococcosis: relationship of environmental and clinical strains of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from urban and rural areas. **Mycopathologia**, v. 159, p. 7-11, 2005.

DROMER, F.; RONIN, O.; DUPONT, B. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from an Asian patient in France: evidence for dormant infection in healthy subjects. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 30, p. 395-397, 1992.

DROMER, F.; MATHOULIN, S.; DUPONT, B.; LAPORTE, A. Epidemiology of Cryptococcosis in France: A 9-Year Survey (1985-1993). **Clinical Infectious Diseases**, v. 23, p. 82-90, 1996.

DROMER, F.; MATHOULIN-PÉLISSIERB, S.; FONTANET, A.; RONIN, O.; DUPONT, B.; LORTHOLARY, O.; ON BEHALF OF THE FRENCH CRYPTOCOCCOSIS STUDY GROUP. Epidemiology of HIV-associated cryptococcosis in France (1985–2001): comparison of the pre- and post- HAART eras. **AIDS**, v. 18, p. 555-562, 2004.

DRUMMOND, E.D.; REIMÃO, J.Q.; DIAS, A.L.T.; SIQUEIRA, A.M. Comportamento de amostras ambientais e clínicas de *Cryptococcus neoformans* frente a fungicidas de uso agrônômico e ao fluconazol. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 209-211, 2007.

ELLIS, D.H. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Australia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 430-431, 1987.

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

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

EMMONS, C.W. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba Livia*). **American Journal of Epidemiology**, v. 62, p. 227-232, 1955.

ERGIN, C.; ILKIT, M.; HILMIOĞLU, S.; KALELI, I.; GÜLBABA, A.G.; DEMIRCI, M.; KAYA, S. The first isolation of *Cryptococcus neoformans* from Eucalyptus trees in South Aegean and Mediterranean Regions of Anatolia in Turkey despite Taurus Mountains alkalinity. **Mycopathologia**, v. 158, p. 43-47, 2004.

ESCANDÓN, P.; QUINTERO, E.; GRANADOS, D.; HUÉRFANO, S.; RUIZ, A.; CASTAÑEDA, E. Isolation of *Cryptococcus gattii* serotype B from detritus of Eucalyptus trees in Colombia. **Biomedica**, v. 25, p. 390-397, 2005.

FARIA, R.O.; NASCENTE, P.S.; MEINERZ, A.R.M.; CLEFF, M.B.; ANTUNES, T.A.; SILVEIRA, E.S.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A.; MELLO, J.R.B. Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos na Cidade de Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 198-200, 2010.

FAVALESSA, O.C.; RIBEIRO, L.C.; TADANO, T.; FONTES, C.J.F.; DIAS, F.B.; COELHO, B.P.A.; HAHN, R.C. Primeira descrição da caracterização fenotípica e susceptibilidade in vitro a drogas de leveduras do gênero *Cryptococcus* spp isoladas de pacientes HIV positivos e negativos, Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 661-665, 2009.

FELDMESSER, M.; KRESS, Y.; NOVIKOFF, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 4225-4237, 2000.

FELDMESSER, M.; TUCKER, S.; CASADEVALL, A. Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. **TRENDS in Microbiology**, v. 9, p. 273-278, 2001.

FERREIRA-PAIM, K.; ANDRADE-SILVA, L.; MORA, D.J.; PEDROSA, A.L.; RODRIGUES, V.; SILVA-VERGARA, M.L. Genotyping of *Cryptococcus neoformans* isolated from captive birds in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Mycoses**, v. 54, p. e294-e300, 2010.

FERRER, C.; COLOM, F.; FRASÉS, S.; MULET, E.; ABAD, J.L.; ALIO, J.L. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2873-2879, 2001.

FILIÚ, W.F.O.; WANKE, B.; AGÜENA, S.M.; VILELA, V.O.; MACEDO, R.C.L.; LÁZERA, M. Cativoiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 591-595, 2002.

FISHER, D.; BURROW, J.; LO, D.; CURRIE, B. *Cryptococcus neoformans* in tropical northern Australia: predominantly variant *gattii* with good outcomes. **Australian & New Zealand Journal of Medicine**, v. 23, p. 678-682, 1993.

FRANZOT, S.P.; SALKIN, I.F.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 838-840, 1999.

FRASER, J.A.; SUBARAN, R.L.; NICHOLS, C.B.; HEITMAN, J. Recapitulation of the sexual cycle of the primary fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: implications for an outbreak on Vancouver Island, Canada. **Eukaryotic Cell**, v. 2, p. 1036-1045, 2003.

FRASER, J.A.; GILES, S.S.; WENINK, E.C.; GEUNES-BOYER, S.G.; WRIGHT, J.R.; DIEZMANN, S.; ALLEN, A.; STAJICH, J.E.; DIETRICH, F.S.; PERFECT, J.R.; HEITMAN, J. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. **Nature**, v. 437, p. 1360-1364, 2005.

FRASÉS, S.; FERRER, C.; SÁNCHEZ, M.; COLOM-VALIENTE, M.F. Molecular epidemiology of isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Spain. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, p. 112-117, 2009.

FRENCH, N.; GRAY, K.; WATREA, C.; NAKIYINGI, J.; LUGADA, E.; MOORE, M.; LALLOO, D.; WHITWORTH, J.A.G.; GILKS, C.F. Cryptococcal infection in a cohort of HIV-1-infected Ugandan adults. **AIDS**, v. 16, p. 1031-1038, 2002.

FRIEDMAN, G.D.; FESSEL, W.J.; UDALTSOVA, N.V.; HURLEY, L.B. Cryptococcosis: 1981-2000 epidemic. **Mycoses**, v. 48, p. 122-125, 2005.

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

GARCIA-HERMOSO, D.; JANBON, G.; DROMER, F. Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 3204-3209, 1999.

GHANNOUM, M.A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, p. 122-143, 2000.

GILES, S.S.; DAGENAIS, T.R.; BOTTS, M.R.; KELLER, N.P.; HULL, C.M. Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 77, p. 3491-3500, 2009.

GRANADOS, D.P.; CASTAÑEDA, E. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colombia, and study of ecological conditions in the area. **Microbial Ecology**, v. 49, p. 282-290, 2005.

GROSSE, P.; TINTELNOT, K.; SÖLLNER, O.; SCHMITZ, B. Encephalomyelitis due to *Cryptococcus neoformans* var *gattii* presenting as spinal tumour: case report and review of the literature. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 70, p. 113-116, 2001.

HANSEMANN, D.V. Über eine bisher nicht beobachtete Gehirner Krankheit durch Hefen. **Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie**, v. 9, p. 21-24, 1905.

HOSTETLER, J.S.; CLEMONS, K.V.; HANSON, L.H.; STEVENS, D.A. Efficacy and safety of amphotericin B colloidal dispersion compared with those of amphotericin B deoxycholate suspension for treatment of disseminated murine cryptococcosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, p. 2656-2660, 1992.

HULL, C.M.; HEITMAN, J. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. **Annual Review of Genetics**, v. 36, p. 557-615, 2002.

IDNURM, A.; BAHN, Y.S.; NIELSEN, K.; LIN, X.; FRASER, J.A.; HEITMAN, J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nature**, v. 3, p. 753-764, 2005.

IGREJA, R.P.; LAZÉRA, M.S.; WANKE, B.; GALHARDO, M.C.; KIDD, S.E.; MEYER, W. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro. **Medical Mycology**, v. 42, p. 229-238, 2004.

IKEDA, R.; SUGITA, T.; JACOBSON, E.S.; SHINODA, T. Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. **Microbiology and Immunology**, v. 47, p. 271-277, 2003.

JACOBSON, E.S.; AYERS, D.J.; HARRELL, A.C.; NICHOLAS, C.C. Genetic and phenotypic characterization of capsule mutants of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Bacteriology**, v. 150, 1292-1296, 1982.

JACOBSON, E.S.; TINNELL, S.B. Antioxidant function of fungal melanin. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 7102-7104, 1993.

JENNEY, A.; PANDITHAGE, K.; FISHER, D.A.; CURRIE, B.J. *Cryptococcus* Infection in Tropical Australia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 3865-3868, 2004.

JONGWUTIWES, U.; SUNGKANUPARPH, S.; KIERTIBURANAKUL, S. Comparison of clinical features and survival between Cryptococcosis in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Positive and HIV-Negative patients. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 61, p. 111-115, 2008.

KATSU, M.; KIDD, S.; ANDO, A.; MORETTI-BRANCHINI, M.L.; MIKAMI, Y.; NISHIMURA, K.; MEYER, W. The internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene show extensive diversity among isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p. 377-388, 2004.

KERKERING, T.M.; DUMA, R.J.; SHADOMY, S. The evolution of pulmonary cryptococcosis: clinical implications from a study of 41 patients with and without compromising host factors. **Annals of Internal Medicine**, v. 94, p. 611-614, 1981.

KIDD, S.E.; HAGEN, F.; TSCHARKE, R.L.; HUYNH, M.; BARTLETT, K.H.; FYFE, M.; MACDOUGALL, L.; BOEKHOUT, L.; KWON-CHUNG, K.J.; MEYER, W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **PNAS**, v. 101, p. 17258-17263, 2004.

KIDD, S.E.; CHOW, Y.; MAK, S.; BACH, P.J.; CHEN, H.; HINGSTON, A.O.; KRONSTAD, J.W.; BARTLETT, K.H. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 1433-1443, 2007.

KON, A.S.; GRUMACH, A.S.; COLOMBO, A.L.; PENALVA, A.C.O.; WANKE, B.; TELLES, F.Q.; SEVERO, L.C.; ARANHA, L.F.; LAZÉRA, M.S.; RESENDE, M.R.; SALMITO, M.A.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.; MORETTI, M.L.; FERREIRA, M.S.; SILVA-VERGARA, M.L.; ANDRADE, N.M.P.; TRABASSO, P.; MENDES, R.P.; MARTINEZ, R. Consenso em criptococose – 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 524-544, 2008.

KOVACS, J.A.; KOVACS, A.A.; POLIS, M.; WRIGHT, W.C.; GILL, V.J.; TUAZON, C.U.; GELMANN, E.P.; LANE, H.C.; LONGFIELD, R.; OVERTURF, G.; MACHER, A.M.; FAUCI, A.S.; PARRILLO, J.E.; BENNETT, J.E.; MASUR, H. Cryptococcosis in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. **Annals of Internal Medicine**, v. 103, p. 533-538, 1985.

KOZEL, T.R.; CAZIN, J. Nonencapsulated variant of *Cryptococcus neoformans*. I. Virulence studies and characterization of soluble polysaccharide. **Infection and Immunity**, v. 3, p. 287-294, 1971.

KOZEL, T.R.; PFROMMER, G.S.; GUERLAIN, A.S.; HIGHISON, B.A.; HIGHISON, G.J. Role of the capsule in phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 10, p. 436-439, 1988.

KOZEL, T.R.; TABUNI, A.; YOUNG, B.J.; LEVITZ, S.M. Influence of opsonization conditions on C3 deposition and phagocyte binding of large- and small-capsule *Cryptococcus neoformans* cells. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 2336-2338, 1996.

KRONSTAD, J.W.; ATTARIAN, R.; CADIEUX, B.; CHOI, J.; D'SOUZA, C.A.; GRIFFITHS, E.J.; GEDDES, J.M.H.; HU, G.; JUNG, W.H.; KRETSCHMER, M.; SAIKIA, S.; WANG, J. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nature**, v. 9, p. 193-203, 2011.

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

KWON-CHUNG, K.J. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus* B and C serotypes. **Mycologia**, v. 68, p. 943-946, 1976.

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

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

KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **American Journal of epidemiology**, v. 120, p. 123-130, 1984.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. Cryptococcosis. In: _____. **Medical Mycology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. p. 397-446.

KWON-CHUNG, K.J.; BOEKHOUT, T.; FELL, J.W.; DIAZ, M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacilliporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). **Taxon**, v. 51, p. 804-406, 2002.

KWON-CHUNG, K.J.; EDMAN, J.C.; WICKES, B.L. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 602-605, 1992.

KWON-CHUNG, K.J.; VARMA, A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? **FEMS Yeast Research**, v. 6, p. 574-587, 2006.

LARSEN, R.A.; BOZZETTE, S.; MCCUTCHAN, J.A.; CHIU, J.; LEAL, M.A.; RICHMAN, D.D.; California Collaborative Treatment Group. Persistent *Cryptococcus neoformans* Infection of the Prostate after Successful Treatment of Meningitis. **American College of Physicians**, v. 111, p. 125-128, 1989.

LARSEN, R.A.; LEAL, M.A.; CHAN, L.S. Fluconazole compared with amphotericin B plus flucytosine for cryptococcal meningitis in AIDS. A randomized trial. **Annals of Internal Medicine**, v. 113, p. 183-187, 1990.

LAZÉRA, M.S.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M.M. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 31, p. 449-454, 1993.

LAZÉRA, M.S.; PIRES, F.D.A.; CAMILO-COURA, L.; NISHIKAWA, M.M.; BEZERRA, C.C.F.; TRILLES, L.; WANKE, B. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 34, p. 127-131, 1996.

LAZÉRA, M.S.; CAVALCANTI, M.A.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M.M.; WANKE, B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*-evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. **Medical Mycology**, v. 36, p. 119-122, 1998.

LAZÉRA, M.S.; CAVALCANTI, M.A.S.; LONDERO, A.T.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M.M.; WANKE, B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Medical Mycology**, v. 38, 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**. 2006. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

LEAL, A.L.; FAGANELLO, J.; BASSANESI, M.C.; VAINSTEIN, M.H. *Cryptococcus* species identification by multiplex PCR. **Medical Mycology**, v. 46, p. 377-383, 2008.

LEE, S.C.; DICKSON, D.W.; CASADEVALL, A. Pathology of cryptococcal meningoencephalitis: Analysis of 27 patients with pathogenetic implications. **Human Pathology**, v. 27, p. 839-847, 1996.

LEIMANN, B.C.Q.; KOIFMAN, R.J. Cryptococcal meningitis in Rio de Janeiro State, Brazil, 1994-2004. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, p. 2582-2592, 2008.

LENGELER, K.B.; COX, G.M.; HEITMAN, J. Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and heterozygous at the mating-type locus. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 115–122, 2001.

LEVITZ, S.M.; BOEKHOUT, T. *Cryptococcus*: The once-sleeping giant is fully awake. **FEMS Yeast Research**, v. 6, p. 461-462, 2006.

LIFSON, A.R.; RHAME, F.S.; BELLOSO, W.H.; DRAGSTED, U.B.; EL-SADR, W.M.; GATELL, J.M.; HOY, J.F.; KRUM, E.A.; NELSON, R.; PEDERSEN, C.; PETT, S.L.; DAVEY JR., R.T. Reporting and Evaluation of HIV-related clinical endpoints in two multicenter international clinical trials. **HIV Clinical Trials**, v. 7, p. 125-141, 2006.

LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, p. 401-416, 2009.

LIN, X.; HULL, C.M.; HEITMAN, J. Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*. **Nature**, v. 434, p. 1017-1021, 2005.

LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, p. 69-105, 2006.

LINDENBERG, A.S.C.; CHANG, M.R.; PANIAGO, A.M.M.; LAZÉRA, M.S.; MONCADA, P.M.F.; BONFIM, G.F.; NOGUEIRA, S.A.; WANKE, B. Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, p. 75-78, 2008.

LINGEGOWDA, B.P.; KOH, T.H.; ONG, H.S.; TAN, T.T. Primary cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii* in Singapore. **Singapore Medical Journal**, v. 52, p. e160-e162, 2011.

LITVINTSEVA, A.P.; THAKUR, R.; RELLER, B.; MITCHELL, T.G. Prevalence of clinical isolates of *Cryptococcus gattii* serotype C among patients with AIDS in Sub-Saharan Africa. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, p. 888-892, 2005.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, R.; SOTO-HERNÁNDEZ, J.L.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; CASTANÓN-OLIVARES, L.R.; ANGELES-MORALES, V.; SOTELO, J. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* among patients with cryptococcal meningitis in Mexico. First observations. **Mycopathologia**, v. 134, p. 61-64, 1996.

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

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

MADRENYS, N.; De VROEY, C.; RAES-WUYTACK, C.; TORRES-RODRÍGUEZ, J.M. Identification of the perfect state of *Cryptococcus neoformans* from 195 clinical isolates including 84 from AIDS patients. **Mycopathologia**, v. 123, p. 65-68, 1993.

MARTINEZ, L.R.; GARCIA-RIVERA, J.; CASADEVALL, A. *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, p. 3365-3367, 2001.

MARTINS, L.M.S. **Epidemiologia da criptococose em crianças e diversidade de *Cryptococcus neoformans* no meio norte do Brasil**. 2003. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro.

MARTINS, M.A.; PAPPALARDO, M.C.S.M.; MELHEM, M.S.C.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. Molecular diversity of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients in the city of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 777-784, 2007.

MATSUMOTO, M.T. **Tipagem Molecular, perfis de sensibilidade e caracterização de transcritos diferencialmente expressos durante a infecção de *Cryptococcus neoformans***. 2006. Tese (Doutorado em Análises Clínicas). Universidade Estadual Paulista. Araraquara.

MATSUMOTO, M.T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; BAEZA, L.C.; MELHEM, M.S.C.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Genotyping, serotyping and determination of mating-type of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from São Paulo state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, p. 41-47, 2007.

MEYER, W.; MITCHELL, T.G.; FREEDMAN, E.Z.; VILGALYS, R. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 2274-2278, 1993.

MEYER, W.; MARSZEWSKA, K.; AMIRMOSTOFIAN, M.; IGREJA, R.P.; HARDTKE, C.; METHLING, K.; VIVIANI, M.A.; CHINDAMPORN, A.; SUKROON-GREUNG, S.; JOHN, M.A.; ELLIS, D.H.; SORRELL, T.C. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA - a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. **Electrophoresis**, v. 20, p. 1790-1799, 1999.

MEYER, W.; CASTAÑEDA, A.; JACKSON, S.; HUYNH, M.; CASTAÑEDA, E. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 189-195, 2003.

MIN, K.H.; KWON-CHUNG, K.J. The biochemical basis for the distinction between the two *Cryptococcus neoformans* varieties with CGB medium. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene**, v. 261, p. 471-480, 1986.

MIRZA, S.A.; PHELAN, M.; RIMLAND, D.; GRAVISS, E. HAMILL, R.; BRANDT, M.E.; GARDNER, T.; SATTAH, M.; DE LEON, G.P.; BAUGHMAN, W.; HAJJEH, R.A. The Changing Epidemiology of Cryptococcosis: An Update from Population-Based Active Surveillance in 2 Large Metropolitan Areas, 1992–2000. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, p. 789-794, 2003.

MITCHELL, T.G.; PERFECT, J.R. Cryptococcosis in the era of AIDS—100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, p. 515-548, 1995.

MONTAGNA, M.T.; VIVIANI, M.A.; PULITO, A.; ARALLA, C.; TORTORANO, A.M.; FIORE, L.; BARBUTI, S. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Italy. Note II.

Environmental investigation related to an autochthonous clinical case in Apulia. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 7, p. 93-96, 1997.

MOREIRA, T.A.; FERREIRA, M.S.; RIBAS, R.M.; BORGES, A.S. Criptococose: estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 255-258, 2006.

MORRIS E, WOLINSKY E. Localized osseous cryptococcosis: A case report. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 47, 1027-1029, 1965.

NEILSON, J.B.; FROMTLING, R.A.; BULMER, G.S. *Cryptococcus neoformans*: Size range of infectious particles from aerosolized soil. **Infection and Immunity**, v. 17, p. 634-638, 1977.

NIELSEN, K.; COX, G.M.; LITVINTSEVA, A.P.; MYLONAKIS, E.; MALLIARIS, S.D.; BENJAMIN JR, D.K.; GILES, S.S.; MITCHELL, T.G.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J.R.; HEITMAN, J. *Cryptococcus neoformans* α strains preferentially disseminate to the Central Nervous System during coinfection. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 4922-4933, 2005.

NISHIKAWA, M.M.; LAZERA, M.S.; BARBOSA, G.G.; TRILLES, L.; BALASSIANO, B.R.; MACEDO, R.C.L.; BEZERRA, C.C.F.; PÉREZ, M.A.; CARDARELLI, P.; WANKE, B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: Analysis of host and regional patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 73-77, 2003.

NOSANCHUK, J.D.; VALADON, P.; FELDMESSER, M.; CASADEVALL, A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* in murine infection. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, p. 745-750, 1999.

NOSANCHUK, J.D.; SHOHAM, S.; FRIES, B.C.; SHAPIRO, D.S.; LEVITZ, S.M.; CASADEVALL, A. Evidence of zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a pet cockatoo to an immunocompromised patient. **Annals of Internal Medicine**, v. 132, p. 205-208, 2000.

OKABAYASHI, K.; HASEGAWA, A.; WATANABE, T. Microreview: Capsule-associated genes of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, v. 163, p. 1-8, 2007.

OLSZEWSKI, M.A.; et al. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. **The American Journal of Pathology**, v. 164, p. 1761-1771, 2004.

ORDÓÑEZ, N.; CASTAÑEDA, E. Varieties and serotypes of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates in Colombia. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 18, p. 128-130, 2001.

OSUNA, P.; CARRAGOSO, A.; LEMOS, A.; MOCHO, M.L.; GASPAR, O. Criptococose. **Acta Medica Portuguesa**, v. 21, p. 307-313, 2008.

PADHYE, A.A.; CHAKRABARTI, A.; CHANDER, J.; KAUFMAN, L. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in India. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 31, p. 165-168, 1993.

PARK, B.J.; WANNEMUEHLER, K.A.; MARSTON, B.J.; GOVENDER, N; PAPPAS, P.G.; CHILLER, T.M. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v. 23, p. 525-530, 2009.

PASSONI, L.F.C. Wood, animals and human beings as reservoirs for human *Cryptococcus neoformans* infection. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 16, p. 77-81, 1999.

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

PEDROSO, R.S.; LAVRADOR, M.A.S.; FERREIRA, J.C.; CANDIDO, R.C.; MAFFEI, C.M.L. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* – Pathogenicity of environmental isolates correlated to virulence factors, susceptibility to fluconazole and molecular profile. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 993-1000, 2010.

PÉREZ, C.; DOLANDE, M.; MOYA, M.; ROSELLÓ, A.; De CAPRILES, C.R.; LANDAETA, M.E.; MATA-ESSAYAG, S. *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*: serotypes in Venezuela. **Mycopathologia**, v. 166, p. 149-153, 2008.

PERFECT, J.R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 3, p. 77-102, 1989.

PERFECT, J.R.; WRIGHT, K.A. Amphotericin B lipid complex in the treatment of experimental cryptococcal meningitis and disseminated candidosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 33, p. 73-81, 1994.

PFEIFFER, T.; ELLIS, D. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans gattii* from California. **Journal Infectious Diseases**, v. 163, p. 929-930, 1991.

POLACHEK, I.; KWON-CHUNG, K.J. Canavanine resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 29, p. 468-473, 1986.

POLACHEK, I.; KWON-CHUNG, K.J. Melanogenesis in *Cryptococcus neoformans*. **Journal of General Microbiology**, v. 134, p. 1037-1041, 1988.

POLACHEK, I.; PLATT, Y.; ARONOVITCH, J. Catecholamines and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 58, p. 2919-2922, 1990.

POWDERLY, W.G. Cryptococcal meningitis and AIDS. **Clinical Infectious Diseases**, v. 17, p. 837-842, 1993.

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

RAMÍREZ, E.V.A. **Estudio de los factores de patogenicidad de *Cryptococcus gattii***. 2008. 140f. Tese (Doutorado em Genética e Microbiologia). Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona.

RESTREPO, A.; BAUMGARDNER, D.J.; BAGAGLI, E.; COOPER JR, C.R.; MCGINNIS, M.R.; LÁZERA, M.S.; BARBOSA, F.H.; BOSCO, S.M.; CAMARGO, Z.P.; COELHO, K.I.; FORTES, S.T.; FRANCO, M.; MONTENEGRO, M.R.; SANO, A.; WANKE, B. Clues to the presence of pathogenic fungi in certain environments. **Medical Mycology**, v. 38, p. 76-77, 2000.

RIBEIRO, C.F.P. **Criptococose: aspectos clínicos e laboratoriais**. 2006. 189f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas). Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória.

RIBEIRO, L.C.; HAHN, R.C.; FAVALESSA, O.C.; TADANO, T.; FONTES, C.J.F. Micoses sistêmicas: fatores associados ao óbito em pacientes com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, Cuiabá, Estado de Mato Grosso, 2005-2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 698-705, 2009.

RODRÍGUEZ-ZARAGOZA, S. Ecology of free-living amoebae. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 20, p. 225-241, 1994.

ROZENBAUM, R.; GONÇALVES, A.J.; WANKE, B.; VIEIRA, W. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in a Brazilian AIDS patient. **Mycopathologia**, v. 112, p. 33-34, 1990.

ROZENBAUM, R.; GONÇALVES, A.J.R. Clinical epidemiological study of 171 cases of cryptococcosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 18, p. 369-380, 1994.

SAAG, M.S.; GRAYBILL, R.J.; LARSEN, R.A.; PAPPAS, P.G.; PERFECT, J.R.; POWDERLY, W.G.; SOBEL, J.D.; Dismukes, W.E. Practice guidelines for the management of cryptococcal meningitis. **Clinical of Infectious Diseases**, v. 30, p. 710-718, 2000.

SANTOS, W.R.A. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* isolados de pacientes com criptococose no Pará, região Norte do Brasil**. 2008. 80f. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária). Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro.

SCHÜRMAN, D.; De MATOS MARQUES, B.; GRÜNEWALD, T.; POHLE, H.D.; HAHN, H.; RUF, B. Safety and efficacy of liposomal amphotericin B in treating AIDS-associated disseminated cryptococcosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 164, p. 620-622, 1991.

SEATON, R.A.; VERMA, N.; NARAQI, S.; WEMBRI, J.P.; WARRELL, D.A. Visual loss in immunocompetent patients with *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* meningitis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, p. 44-49, 1997.

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

SEVERO, L.C.; OLIVEIRA, F.M.; LONDERO, A.T. Cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Brazilian patients with AIDS: Report of three cases. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 16, p. 152-154, 1999.

SHARKEY, P.K.; GRAYBILL, J.R.; JOHNSON, E.S.; HAUSRATH, S.G.; POLLARD, R.B.; KOLOKATHIS, A.; MILDVAN, D.; FAN-HAVARD, P.; ENG, R.H.; PATTERSON, T.F.; POTTAGE JR, J.C.; SIMBERKOFF, M.S.; WOLF, J.; MEYER, R.D.; GUPTA, R.; LEE, L.W.; GORDON, D.S. Amphotericin B lipid complex compared with amphotericin B in the treatment of cryptococcal meningitis in patients with AIDS. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, p. 315-321, 1996.

SHAW, C.E.; KAPICA, L. Production of diagnostic pigment by phenoloxidase activity of *Cryptococcus neoformans*. **Applied Microbiology**, v. 24, p. 824-830, 1972.

SORRELL, T.C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. **Medical Mycology**, v. 39, p. 155-168, 2001.

SOUZA, L.K.H.; SOUZA JUNIOR, A.H.; COSTA, C.R.; FAGANELLO, J.; VAINSTEIN, M.H.; CHAGAS, A.L.B.; SOUZA, A.C.M.; SILVA, M.R.R. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* species complex isolates in Goiania, Brazil. **Mycoses**, v. 53, p. 62-67, 2009.

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

SPRINGER, D.J.; CHATURVEDI, V. Projecting Global Occurrence of *Cryptococcus gattii*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, p. 14-20, 2010.

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 15245-15250, 2001.

STEENBERGEN, J.N.; CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 667-675, 2003.

STEPHEN, C.; LESTER, S.; BLACK, W.; FYFE, M.; RAVERTY, M. Multispecies outbreak of cryptococcosis on southern Vancouver Island, British Columbia. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 43, p. 792-794, 2002.

SUBRAMANIAN, S.; MATHAI, D. Clinical manifestations and management of cryptococcal infection. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 51, p. s21-s26, 2005.

SUKROONGREUNG, S.; NILAKUL, C.; RUANGSOMBOON, O.; CHUAKUL, W.; EAMPOKALAP, B. Serotypes of *Cryptococcus neoformans* isolated from patients prior to and during the AIDS era in Thailand. **Mycopathologia**, v. 135, p. 75-78, 1996.

SWINNE, D.; DEPPNER, M.; LAROCHE, R.; FLOCH, J.J.; KADENDE, P. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from houses of AIDS-associated cryptococcosis patients in Bujumbura(Burundi). **AIDS**, v. 3, p. 389-390, 1989.

SWINNE, D.; De VROEY, C. Detection of circulating capsular polysaccharide antigen from *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 2521, 1992.

SWINNE, D.; Taelman, H.; Batungwanayo, J.; Bigirankana, A.; Bogaerts, J. Ecology of *Cryptococcus neoformans* in central Africa. **Medicine Tropical (Mars)**, v. 54, p. 53-55, 1994.

TAY, S.T.; Rohani, M.Y.; Soo Hoo, T.S.; Hamimah, H. Epidemiology of cryptococcosis in Malaysia. **Mycoses**, v. 53, p. 509-514, 2009.

Thiruchelvan, N.; Wu, K.Y.; Arseculeratne, S.N.; Ashraf-Haq, J. Apseudo-cryptococcal artefact derived from leucocytes in wet India ink mounts of centrifuged cerebrospinal fluid. **Journal of Clinical Pathology**, v. 51, p. 246-248, 1998.

Tintelnot, K.; Schär, G.; Polak, A. Epidemiological data of cryptococcosis in Austria, Germany and Switzerland: part of the ECMM survey in Europe. European Confederation of Medical Mycology. **Mycoses**, v. 44, p. 345-350, 2001.

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

Tomás, M.T.B. **Epidemiología de la criptococosis en España: Caracterización de los aislados de *Cryptococcus neoformans***. 2002. 123f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona.

Torres-Guererro, H.; Edman, J.C. Melanin-deficient mutants of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 32, p. 303-313, 1994.

Tortorano, A.M.; Viviani, M.A.; Rigoni, A.L.; Cogliati, M.; Roverelli, A.; Pagano, A. Prevalence of serotype D in *Cryptococcus neoformans* isolates from HIV positive and HIV negative patients in Italy. **Mycoses**, v. 40, p. 297-302, 1997.

Trilles, L.; Lazéra, M.; Wanke, B.; Theelen, B.; Boekhout, T. Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. **Medical Mycology**, v. 41, p. 383-390, 2003.

Trilles, L.; Lazéra, M.S.; Wanke, B.; Oliveira, R.V.; Barbosa, G.G.; Nishikawa, M.M.; Morales, B.P.; Meyer, W. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 455-462, 2008.

TROMBETTA, L.; BAVA, A.J. Manifestaciones clínicas de la criptococosis asociada al SIDA. **Revista Panamericana de Infectología**, v. 10, p. 13-16, 2008.

TSCHARKE, R.L.; LAZERA, M.; CHANG, Y.C.; WICKES, B.L.; KWON-CHUNG, K.J. Haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans* is not mating type alpha-specific. **Fungal Genetics and Biology**, v. 39, p. 230-237, 2003.

TUCKER, S.C.; CASADEVALL, A. 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, p. 3165-3170, 2002.

VELAGAPUDI, R.; HSUEH, Y.P.; GEUNES-BOYER, S.; WRIGHT, J.R.; HEITMAN, J. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 77, p. 4345-4355, 2009.

VELEGRAKI, A.; KIOSSES, V.G.; PITSOUNI, H.; TOUKAS, D.; DANIILIDIS, V.D.; LEGAKIS, N.J. First report of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype B from Greece. **Medical Mycology**, v. 39, p. 419-422, 2001.

VILCINS, I.; KROCKENBERGER, M.; AGUS, H.; CARTER, D. Environmental sampling for *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from the Blue Mountains National Park, Sydney, Australia. **Medical Mycology**, v. 40, p. 53-60, 2002.

VIVIANI, M.A.; COGLIATI, M.; ESPOSTO, M.C.; LEMMER, K.; TINTELNOT, K.; VALIENTE, M.F.C.; SWINNE, D.; VELEGRAKI, A.; VELHO, R.; THE EUROPEAN CONFEDERATION OF MEDICAL MYCOLOGY (ECMM) CRYPTOCOCCOSIS WORKING GROUP. Molecular analysis of 311 *Cryptococcus neoformans* isolates from a 30-month ECMM survey of cryptococcosis in Europe. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 6, p. 614-619, 2006.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 3864-3866, 1994a.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 3004-3007, 1994b.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: Mechanism of action. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 3131-3136, 1995.

WICKES, B.L.; MAYORGA, M.E.; EDMAN, U.; EDMAN, J.C. Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: Association with the a-mating type. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 7327-7331, 1996.

ZARAGOZA, O.; RODRIGUES, M.L.; DE JESUS, M.; FRASES, S.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Advances in Applied Microbiology**, v. 68, p. 133-216, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Baseado na Resolução Nº 196 de 10/10/1996 do Conselho Nacional de Saúde)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Caro(a) Senhor(a),

O Senhor(a) foi convidado a participar da pesquisa “**CRIOCOCOSE: PERFIL DA MORBIMORTALIDADE DOS PACIENTES ATENDIDOS EM UMA UNIDADE DE REFERÊNCIA NO ESTADO DO PARÁ**” que está sendo realizado por alunos e docentes do Curso de Medicina da Universidade Federal do Pará.

A pesquisa tem como objetivos caracterizar e avaliar o perfil clínico-epidemiológico da criotocose em pacientes atendidos em uma unidade de referência no estado do Pará.

A sua participação nesta pesquisa é voluntária e apresentará riscos mínimos inerentes as colheitas de material para pesquisa do fungo (sangue, líquido e material de biópsia, quando necessário), principalmente dor local e pequenos sangramentos. Caso se sinta constrangido, lhe é garantida a liberdade da retirada do seu consentimento, podendo deixar de participar do estudo.

Informamos que o(a) Senhor(a) tem a garantia de acesso, em qualquer etapa do estudo, sobre qualquer esclarecimento de dúvidas; poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB).

O(A) Senhor(a) tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais da pesquisas. Não existirão despesas ou compensações pessoais. Não há compensação financeira relacionada à sua participação.

Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados coletados somente para a pesquisa. O formulário não é identificável e em nenhuma hipótese serão divulgados dados que permitam a sua identificação, guardando assim o absoluto **sigilo das informações pessoais**.

Abaixo está o consentimento livre e esclarecido para ser assinado caso não tenha ficado qualquer dúvida.

CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO:

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo da mesma, ficando claros para mim, quais são os propósitos da pesquisa, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Declaro ainda que por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com todas as informações, podendo retirar meu consentimento a qualquer momento sem necessidade de justificar o motivo da desistência, antes ou durante o mesmo, sem penalidades.

Assinatura do Entrevistado

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o consentimento livre e esclarecido deste profissional para participação no presente estudo.

Assinatura do Entrevistador

RITA CATARINA MEDEIROS SOUSA

Prof. Dra. Adjunta III da FM/ICS/UFPa
Contato: 32142012

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB) (CEP-HUJBB/UFPa) – Rua dos Mundurucus, nº 4487, Guamá – Belém – Pará. Tel: (91) 3201-6652/3201-6653; e-mail: cephujbb@ufpa.br

APÊNDICE B - FICHA DE ACOMPANHAMENTO CLÍNICO

PROJETO CRIPTOCOCOSE: PERFIL DA MORBIMORTALIDADE DOS PACIENTES ATENDIDOS EM UMA UNIDADE DE REFERÊNCIA NO ESTADO DO PARÁ.

Dados Pessoais			
Nome:		Matricula:	
Endereço:		Fone:	
Município procedência:		Sexo:	
Matrícula:	Ocupação:		
Estado civil:	DN:	Idade:	
Escolaridade:			
Dados de Internação			
Data Internação:		Data alta:	
Dados Clínicos			
Tempo de doença até diagnóstico:			
Manifestações clínicas durante internação: S ou N 1. Febre () 2. Cefaléia () 3. Vômitos () 4. Desorientação () 5. Crises convulsivas () 6. Diminuição da audição () 7. Diminuição acuidade visual ()		8. Rigidez de Nuca () 9. Edema de papila () 10. Kernig () 11. Brudzinski () 12. Hemiplegia () 13. Hemiparesia () 14. Lesões cutâneas ()	
Co-morbidades: S ou N 1. Aids () 2. Neoplasia () 3. Diabetes () 4. Tuberculose () 5. Lupus eritematoso sistêmico ()		6. Corticoterapia prolongada () 7. Gravidez () 8. Outro imunossupressor () 9. Alcoolismo () 10. Outros ()	
Intercorrências clínicas na internação: S ou N 4.1 Infecção hospitalar () 4.1 UTI () 4.1 Ventilação Mecânica ()		4.1 Insuficiência Renal Aguda () 4.1 Alterações cardiológicas () 4.1 Hepatopatias ()	
Dados Laboratoriais			
Hemograma		2 Neut:	4 Plaquetas:
Leucometria:		3 linf:	
Uréia:	Sódio:	ALT:	Tipo sang:
Creatinina:	Cálcio:	AST:	
Potássio:	VDRL:	CD4+:	
Líquido céfalo-raquidiano			
N <input type="checkbox"/> punções lombares para diagnóstico:			
No total de PL durante o tratamento:		Tempo para negativação:	

4.9	Aspecto:	4.9	Proteinorraquia:	4.9	Látex:
4.9	Pressão:	4.9	Glicorraquia:	4.9	Cultura:
4.9	Citometria:	4.9	Tinta da China:	4.9	Espécie:
4.9	Citologia:				
Pesquisa de C. no escarro: () Pesquisa na lesão cutânea: () Realizado (R), Não Realizado (NR), Positivo (P), Negativo (N)					
Tratamento: S ou N					
Anfotericina B desoxicolato () dose acumulada =					
Fluconazol () dose:					
Flucitosina () dose:					
Exames Complementares: (descrição)					
ECG:					
Radiografia simples de tórax:					
TC de Crânio:					
TC de Tórax:					
Exames Especializados					
Exame Neurológico: (/ /)					
Exame Oftalmológico: (/ /)					
Análise de lesão do nervo óptico:					
Evolução: S ou N					
	5. Cura com seqüela ()	4.5	Desaparecido ()		
	5. Cura sem seqüela ()	4.5	Óbito por outra causa ()		
	5. Óbito por Criptococose ()				

ANEXOS

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HUIBB.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP



TERMO DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário João de Barros Barreto da Universidade Federal do Pará analisou o projeto de pesquisa intitulado **“Criptococose: Perfil da morbimortalidade dos pacientes atendidos em uma unidade de referência no Estado do Pará”**, protocolo nº1347/10, sob a responsabilidade das pesquisadoras Cylia Oliveira Guedes Pereira, Isabela Trindade Torres, Karen Cristini Yumi Ogawa Furtado, Tatiana YUriko Yonekura de Sousa, Rose Sheyla Rodrigues Carneiro, Lúcia Thereza Mascarenhas Freire, Roseana Beltrão da Silva Sovano e Taíssa Costa de Carvalho, orientação da *Profa. Dra. Rita Catarina Medeiros Sousa*, obtendo **APROVAÇÃO** na reunião do dia 04.02.2011, por estar de acordo com a Resolução nº196/96 e suas complementares do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde do Brasil.

Recomendamos a coordenação que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Deverá ser encaminhado relatório semestral e, ao final, elaborado um relatório consolidado, incluindo os resultados finais da pesquisa, em prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da pesquisa.

Situação: *Aprovado.*

Belém, 04 de fevereiro de 2011.

Dr. João Soares Felício

Francisco C. L. Mesquita
Infectologista - CRM 1745

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa / HUIBB/UFPA

Hospital Universitário João de Barros Barreto – Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/HUIBB/UFPA
Rua dos Mundurucus, 4487 - Guamá CEP. 66.073-000 Belém / Pará - Brasil Fone/Fax: (91)3201 6652/ PABX:
(91)3201 6600 Ramal: 6653
E-mail: cephuibb@yahoo.com.br