



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

FABÍOLLA NASCIMENTO DO CARMO

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE
Cryptococcus spp. E AVALIAÇÃO DO PERFIL DE VIRULÊNCIA *in*
vitro E EM MODELO DE *Galleria mellonella***

FABIOLLA NASCIMENTO DO CARMO

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE *Cryptococcus*
spp. E AVALIAÇÃO DO PERFIL DE VIRULÊNCIA *in vitro* E EM MODELO DE
*Galleria mellonella***

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE pelo programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Microbiologia/Imunologia. Linha de pesquisa: Doenças infecciosas de interesse médico-odontológico.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Liliana Scorzoni

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Patrícia Pimentel de Barros

São José dos Campos

2021

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2022]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Carmo, Fabíolla Nascimento Do

Caracterização genotípica de amostras clínicas de *Cryptococcus* spp. e avaliação do perfil de virulência in vitro e em modelo de *Galleria mellonella* / Fabíolla Nascimento Do Carmo. - São José dos Campos : [s.n.], 2021.
81 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2021.

Orientadora: Líliliana Scorzoni

Coorientadora: Patrícia Pimentel de Barros

1. *Galleria mellonella*. 2. *Cryptococcus*. 3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). 4. Suscetibilidade antifúngica. I. Scorzoni, Líliliana, orient. II. Barros, Patrícia Pimentel de, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática, ICMC/USP
com adaptações - STATI, STRAUD e DTI do ICT/UNESP.
Renata Aparecida Couto Martins CRB-8/8376

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Liliana Scorzoni (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof.^a Dr.^a Luciane Dias de Oliveira

Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof.^a Dr.^a Julhiany de Fátima da Silva

Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Faculdade de Medicina de Botucatu

Campus de Botucatu

São José dos Campos, 02 de agosto de 2021.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos alunos que virão, como o início do meu preparo para nossa troca de conhecimentos científicos e experiências de vida.

AGRADECIMENTOS

Você já ouviu Deus falar com você? Eu tenho ouvido várias vezes ao longo da minha vida. Uma vez, Ele veio me dizer, como quem sussurra palavras de amor ao meu ouvido: “Eu não desisti de você!” E como Ele não mente, um sonho de 20 anos, já esquecido, começou a tomar forma e hoje se concretiza com esse trabalho. Minha eterna gratidão ao Deus que tanto me ama, a quem eu chamo de “Papai”.

Deus é tão amável que colocou em meu caminho pessoas “pra lá de especiais”, sem as quais eu não conseguiria concluir essa tarefa. Ele me deu o apoio dos meus tão queridos pais, irmãos, sobrinhos, e cunhadas, além do aconchego precioso do abraço dos meus filhos Isabella e Rafael. Impossível descrever o tamanho dessa gratidão! Não bastasse isso, além da minha família biológica, Deus me deu uma família espiritual, amigos verdadeiros, que me apoiaram nesse trabalho com orações e carinho. Á vocês minha eterna gratidão! Mas, eu precisava de um pouco mais de ajuda para essa missão... Então, encontrei um “time de peso” que me orientou nessa jornada científica. Meu muito obrigada à orientadora Líliana Scorzoní, à co-orientadora Patrícia Pimentel de Barros, às professoras Juliana Campos Junqueira e Julhiany de Fátima da Silva que muito contribuíram, à incansável Maíra e aos demais colegas, aos funcionários e professores do programa de pós-graduação de Microbiologia e Imunologia do ICT Unesp de São José dos Campos, bem como à sua coordenação representada pela professora Luciane Dias de Oliveira. Obrigada por fazerem parte do meu presente e me alavancarem para o meu futuro!

Finalizo essa breve palavra com uma frase do apóstolo Paulo em II Coríntios 2 - 9: “Olho nenhum viu, ouvido nenhum ouviu, mente nenhuma imaginou o que Deus preparou para aqueles que o amam”.

*"Pois Dele (Jesus), por Ele e para Ele são todas as coisas.
A Ele seja a glória para sempre! Amém". Romanos 11:36*

SUMÁRIO

RESUMO.....	09
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 PROPOSIÇÃO	25
2.1 Objetivos específicos.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Origem das cepas e condições de cultivo	26
3.2 Identificação de <i>Cryptococcus</i> spp. por métodos microbiológicos clássicos	27
3.3 Caracterização dos isolados por biologia molecular	27
3.3.1 Extração de DNA.....	27
3.3.2 Quantificação do DNA extraído	28
3.3.3 Identificação molecular por PCR singleplex	29
3.4 Caracterização das amostras clínicas <i>in vitro</i>	30
3.4.1 Avaliação da atividade antifúngica e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	30
3.4.2 Análise da formação do biofilme.....	33
3.4.2.1 Avaliação da viabilidade celular por cristal violeta	33
3.4.2.2 Avaliação da viabilidade celular por 2,3-Bis-(2-Metoxi-4-Nitro-5- Sulfofenil) - 2H-Tetrazolium-5-Carboxanilida (XTT).....	34
3.5 Caracterização dos isolados clínicos <i>in vivo</i> em modelo de <i>Galleria mellonella</i>	34
3.5.1 Cultura das larvas de <i>Galleria mellonella</i> e condições experimentais	34
3.5.2 Determinação da virulência por curva de sobrevivência.....	35
3.5.3 Avaliação do índice de saúde em <i>Galleria mellonella</i>	35
3.5.4 Avaliação dos tamanhos da cápsula e corpo de <i>Cryptococcus</i> spp. pós inoculação em <i>Galleria mellonella</i>	36
3.6 Análise estatística	38
4 RESULTADO	39
4.1 Identificação de <i>Cryptococcus</i> por métodos microbiológicos clássicos	39

4.2 Caracterização dos isolados por biologia molecular	39
4.2.1 Quantificação do DNA extraído	39
4.2.2 Identificação molecular por PCR singleplex	40
4.3 Caracterização das amostras clínicas <i>in vitro</i>	41
4.3.1 Avaliação da atividade antifúngica e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	41
4.3.2 Análise da formação do biofilme.....	44
4.3.2.1 Avaliação da biomassa do biofilme por cristal violeta.....	44
4.3.2.2 Avaliação da atividade celular do biofilme por XTT	45
4.4 Caracterização dos isolados clínicos <i>in vivo</i> em modelo <i>Galleria mellonella</i>	47
4.4.1 Determinação da virulência por curva de sobrevivência.....	47
4.4.2 Avaliação do índice de saúde de larvas de <i>Galleria mellonella</i>	49
4.4.3 Avaliação dos diâmetros do corpo e cápsula de <i>Cryptococcus</i> spp.....	52
5 DISCUSSÃO	55
6 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS.....	64
ANEXO.....	75

Carmo FN. Caracterização genotípica de amostras clínicas de *Cryptococcus* spp. e avaliação do perfil de virulência *in vitro* e em modelo de *Galleria mellonella* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2021.

RESUMO

A criptococose é uma infecção oportunista comum em pacientes HIV positivos, mas também pode afetar pacientes com outras comorbidades imunológicas ou imunocompetentes. Neste trabalho, cepas clínicas de *Cryptococcus* spp. provenientes de hospitais de São José dos Campos (SP) foram identificadas pela amplificação do gene *SRT*. A seguir, foi avaliada a sensibilidade das cepas a fluconazol e anfotericina B (AMB) pela técnica de microdiluição conforme EUCAST. Também foi analisada a capacidade de formação de biofilme por cristal violeta (formação da biomassa) e XTT (viabilidade celular). Foram analisadas *in vivo* a formação da cápsula durante a infecção, a curva de sobrevivência e do índice de saúde em modelo invertebrado de *Galleria mellonella*. Seis cepas foram identificadas como *C. neoformans* var. *grubii* e uma como *C. gattii*. Todas as cepas clínicas foram sensíveis a AMB e a concentração inibitória mínima para fluconazol variou entre 2 e 32 µg/mL. Todos os isolados de *Cryptococcus* spp. foram capazes de produzir biofilme. A sobrevivência de *G. mellonella* infectada variou entre 6 e 7 dias para *C. neoformans*, e a cepa clínica 6 se mostrou menos virulenta, com 24% das larvas vivas no último dia de experimento. Para cepa de *C. gattii*, 20,8% das larvas infectadas permaneceram vivas ao final da análise. Em relação à análise do tamanho da cápsula após inoculação *in vivo*, as cepas clínicas de ambas espécies apresentaram aumento no tamanho, sendo observado o maior percentual de cápsulas $\geq 30\mu\text{m}$ na cepa 6. O índice de saúde foi capaz de agregar informações ao resultado da curva de sobrevivência de *G. mellonella*, uma vez que ele mostrou diferenças de saúde das larvas entre os grupos que apresentaram mesmo perfil de sobrevivência. A associação do índice de saúde à curva de sobrevivência amplia a visão da vitalidade das larvas durante os dias de experimento e, ainda, auxilia na comparação de resultados entre laboratórios. O conhecimento das características genotípicas e fenotípicas de *Cryptococcus* spp. em uma determinada região pode ser ferramenta importante para implementação de políticas públicas de saúde eficazes.

Palavras-chave: *Galleria mellonella*. *Cryptococcus*. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Susceptibilidade antifúngica.

Carmo FN. Genotypic characterization of clinical samples of Cryptococcus spp. and evaluation of the virulence profile in vitro and in a Galleria mellonella model [dissertation]: São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2021.

ABSTRACT

Cryptococcosis is a common opportunistic infection in HIV-positive patients, but it can also affect patients with other immunological comorbidities or immunocompetent. In this work, clinical strains of Cryptococcus spp. from hospitals in São José dos Campos (SP) were identified by amplification of the SRT gene. Next, the sensitivities of the strains to fluconazole and amphotericin B (AMB) were evaluated by the microdilution technique according to EUCAST. Biofilm formation capacity by crystal violet (biomass formation) and XTT (cellular viability) was also analyzed. Capsule formation during infection, survival curve and health index in an invertebrate model of Galleria mellonella were analyzed in vivo. Six strains were identified as C. neoformans var. grubii and one as C. gattii. All clinical strains were sensitive to AMB and the minimum inhibitory concentration for fluconazole ranged between 2 and 32 µg/mL. All Cryptococcus spp. were able to produce biofilm. The survival of infected G. mellonella ranged between 6 and 7 days for C. neoformans, and the clinical strain 6 was less virulent, with 24% of larvae alive on the last day of the experiment. For the C. gattii strain, 20.8% of the infected larvae remained alive at the end of the analysis. Regarding the analysis of capsule size after in vivo inoculation, the clinical strains of both species showed an increase in size, with the highest percentage of capsules $\geq 30\mu\text{m}$ being observed in strain 6. The health index was able to add information to the result of the survival curve of G. mellonella, since it showed differences in the health of larvae between the groups that presented the same survival profile. The association of the health index to the survival curve broadens the vision of the larvae's vitality during the days of the experiment and also helps in comparing the results between laboratories. The knowledge of the genotypic and phenotypic characteristics of Cryptococcus spp. in a given region, it can be an important tool for the implementation of effective public health policies.

Keywords: Galleria mellonella. Cryptococcus. Polymerase Chain Reaction (PCR). Antifungal susceptibility

1 INTRODUÇÃO

A criptococose é uma doença fúngica sistêmica, mundialmente disseminada, que acomete humanos, sendo causada por um complexo de fungos do gênero *Cryptococcus*. Estima-se que a cada ano a criptococose acometa quase 220.000 indivíduos, dos quais 181.000 casos resultam em morte (Rajasingham et al., 2017). Segundo a Organização Mundial de Saúde, dentre as doenças infecciosas com maiores números absolutos de morte, a criptococose apresenta-se em quinto lugar, ficando atrás da tuberculose, AIDS, malária e diarreia (World Health Organization, 2018). Na América Latina, o estudo da criptococose e seus agentes etiológicos têm se tornado cada vez mais importante, devido à significativa morbidade e mortalidade causada por esta micose nesta região. Mais de 5.000 indivíduos são afetados com meningite criptocócica a cada ano e 2.400 mortes anuais são computadas somente na América Latina (Firacative et al., 2018).

O Fundo Global de Inovação para Doenças Negligenciadas (G-Finder) incluiu a meningite criptocócica no grupo de doenças negligenciadas para investimento global em pesquisa e desenvolvimento (P&D) somente em 2018, sendo os investimentos voltados exclusivamente para área de medicamento. A organização brasileira Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) participou pela primeira vez do investimento em P&D para meningite criptocócica nesse ano, com menos de < 0,1% do total patrocinado por outras 6 organizações internacionais. Destas últimas, o maior financiador de pesquisas em estágio inicial foi o National Institutes of Health (NIH) dos Estados Unidos (Chapman et al., 2020). Apesar das alarmantes taxas de mortalidade, em anos anteriores a 2017, a criptococose havia recebido menos de 0,5% do financiamento global de P&D (Molloy et al., 2017), o que comprometeu o estabelecimento de programas governamentais e institucionais de financiamento de pesquisa (Rodrigues, 2016). Até esse momento, a criptococose não é doença de notificação compulsória no Brasil, o que dificulta levantamentos estatísticos e epidemiológicos mais precisos sobre sua ocorrência neste país.

A criptococose ocorre por inalação de leveduras ou esporos, causando

inicialmente infecção pulmonar, com possibilidade de progressão para o sistema nervoso central, podendo causar meningite fatal (Herkert et al., 2018). Em menor proporção, afeta os pulmões, pele (Christianson et al., 2003), olhos, entre outros órgãos (Firacative et al., 2018; May et al., 2016).

Cinco principais tipos moleculares são reconhecidos dentro do complexo de espécies de *C. neoformans*: VNI, VNII e VNB, todos apresentando o antígeno capsular A (sorotipo A) e classificados como *C. neoformans* var. *grubii*; VNIV apresentando o antígeno capsular D (sorotipo D) e classificado como *C. neoformans* var. *neoformans*; e VNIII que representa híbridos diplóides e aneuploides entre as duas variedades (híbridos AD). Já o complexo de espécies de *Cryptococcus gattii* inclui pelo menos quatro tipos moleculares: VGI (sorotipo B), VGII (sorotipo B), VGIII (sorotipo B ou C) e VGIV (maioria do sorotipo C) (Ngamskulrungroj et al., 2009). O quadro 1 traz a correlação dos sorotipos e tipos moleculares do complexo de espécies patogênicas *C. neoformans* / *C. gattii*.

Quadro 1 - Classificação de espécies patogênicas de *Cryptococcus*

Sorotipo	Espécie e variantes	Tipos moleculares
A	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	VNI, VNII e VNB
B	<i>C. gattii</i>	VGI, VGII, VGIII, VGIV
C	<i>C. gattii</i>	VGIII, VGIV
D	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	VNIV
AD	<i>C. neoformans</i>	VNIII

Fonte: Adaptado de Hagen et al., 2015.

Em 2013, Cogliati constatou que cerca de 10% dos mais de 68.000 isolados de *Cryptococcus* relatados em literatura haviam sido tipificados molecularmente. É muito provável que linhagens adicionais sejam encontradas à medida que mais cepas forem analisadas e seus relacionamentos com linhagens já existentes estabelecidos. Em função disso, os nomes “complexo de espécies *C. neoformans*” e “complexo de espécies *C. gattii*” foi proposto

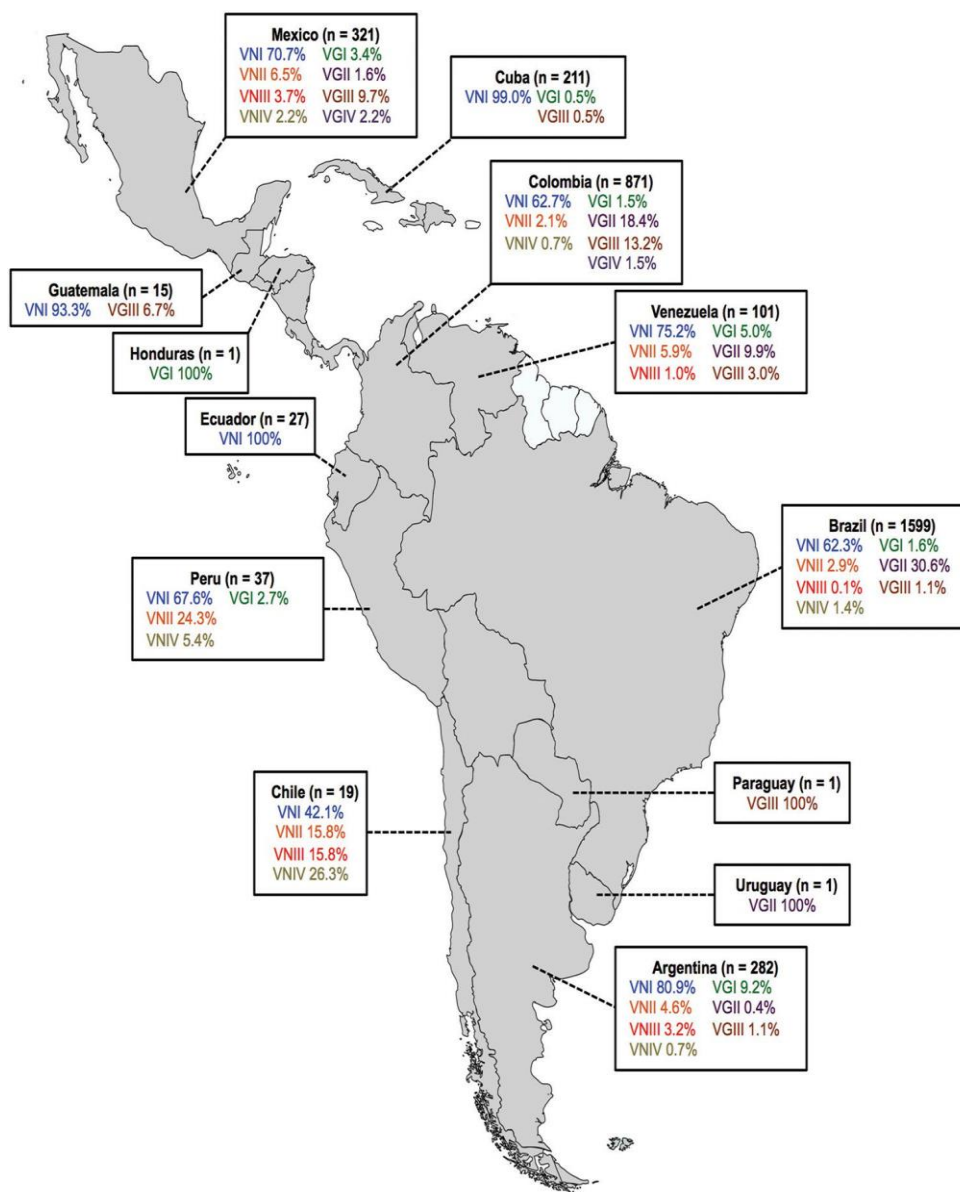
para indicar que ambas as espécies contêm linhagens geneticamente diversas, mas é prematuro traçar limites entre as linhagens para garantir cada uma delas como espécies separadas. O status de “complexo de espécies” foi provisório por causa da estabilidade de nomenclatura até que a grande maioria das populações criptocócicas seja analisada e o caráter de cada linhagem se torne prontamente identificável (Hagen et al., 2017; Kwon-Chung et al., 2017)

Firacative et al. (2018) avaliaram a combinação de estudos dos principais tipos moleculares de *Cryptococcus* na América latina e o resultado pode ser visto na figura 1.

No Brasil, Almeida e Lacaz (1941) relataram o primeiro caso de criptococose. Oliveira-Netto et al. (1993), em um dos primeiros estudos retrospectivos neste país, observaram que, de 308 casos ocorridos entre 1941 e 1992, mais da metade deles (179 - 59,3%) haviam acontecido nos últimos 10 anos do estudo, período que coincidiu com o avanço mundial da infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana – HIV.

Um conjunto de estudos realizados entre 2004 e 2020 no Brasil, consideraram a tipagem molecular em amostras clínicas de 1204 pacientes, entre eles indivíduos imunodeprimidos (pacientes com AIDS, transplantados ou em uso prolongado de corticóide) e imunocompetentes. A prevalência de genótipos em amostras clínicas provenientes de doze estados brasileiros foi de 80,07% de *C. neoformans* VNI; 5,73% de *C. neoformans* VNII; 0,17% de *C. neoformans* VNIV e 0,33% para *C. neoformans* VNB. Para *C. gattii*, a prevalência encontrada foi de 0,42% para VGI; 12,79% para VGII e 0,50% para VGIII (Aguilar et al., 2017; Andrade-Silva et al., 2018; Favalessa et al., 2014; Figueiredo et al., 2016; Firacative et al., 2018; Freire et al., 2012; Herkert et al., 2018; Igreja et al., 2004; Khell Da Silva et al., 2012; Martins et al., 2011; Matos et al., 2012; Matsumoto et al., 2007; Mora et al., 2010; Nunes et al., 2018; Ponzio et al., 2019; Dos Santos et al., 2008; de Sousa Tsujisaki et al., 2013; Souto et al., 2016; Vilas-bôas et al., 2020; Villena et al., 2008; Wirth et al., 2018). Apenas um dos autores relatou a presença do tipo molecular VNB (Ponzio et al., 2019) em pacientes submetido à transplante renal. O quadro 2 mostra os tipos moleculares encontrados em cada estudo.

Figura 1 – Distribuição geográfica das variantes de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gatti* na América Latina



Nota: Os dados moleculares foram combinados a partir de estudos relatados na Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Cuba, Equador, Guatemala, Honduras, México, Paraguai, Peru, Uruguai e Venezuela. Dados da Bolívia, Costa Rica, República Dominicana, El Salvador, Haiti, Nicarágua e Panamá em relação à tipagem molecular de cepas criptocócicas não foram relatados.

Fonte: Firacative et al., 2018.

Na cidade de Porto Alegre – RS, uma prevalência distinta da do restante do Brasil foi observada para o tipo molecular VNII, com predomínio de

69,2% em pacientes portadores de HIV (Wirth et al., 2018). O número pequeno de amostras avaliadas (n = 15) pode ser um fator contribuinte para esta prevalência discrepante.

Um outro estudo que considerou 356 isolados de fontes anteriores (Boekhout et al., 2001; Igreja et al., 2004; Meyer et al., 2003; Ribeiro et al., 2006; Trilles et al., 2003), somados a 87 novos isolados, demonstrou prevalências genotípicas semelhantes às observadas no quadro 2 (Trilles et al., 2008).

Cryptococcus neoformans é o patógeno oportunista causador de meningite fúngica mais importante no mundo, e, na África subsariana, a meningite criptocócica é o tipo mais comum de meningite em adultos infectados pelo HIV (Rajasingham et al., 2017). Já o *C. gattii* é um patógeno primário responsável por 70 a 80% das infecções em pacientes imunocompetentes (Herkert et al., 2017). A fisiopatologia e as manifestações clínicas de *C. gattii* e *C. neoformans* diferem entre si, uma vez que *C. neoformans* tem sido frequentemente associado com envolvimento do sistema nervoso central e *C. gattii* com doença pulmonar grave (Hansakon et al., 2019).

Estudos que avaliaram a criptococose em pacientes imunocompetentes relataram que a presença de autoanticorpos contra fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos é fator de risco para infecção do sistema nervoso central por *C. gattii* (Saijo et al., 2014; Stevenson et al., 2019). Bielska, May (2016), relataram que uma falha de *C. gattii* em induzir resposta imune eficaz entre os indivíduos saudáveis também podem predispor a infecção por esse patógeno. Estudos relacionados sugeriram que *C. gattii* provoca uma imunidade menos protetora do que *C. neoformans*, uma vez que cepas de *C. gattii* induzem resposta inflamatória menos expressiva em camundongos, inibindo ou não provocando a migração de neutrófilos para os locais de infecção. A produção de citocinas protetoras, como o fator de necrose tumoral alfa, também se mostrou reduzida em comparação com a capacidade das cepas de *C. neoformans* (Cheng et al., 2009).

Quadro 2 – Prevalência de *Cryptococcus* spp. em diferentes Estados do Brasil

Autor	Localização - Estado	Total de amostras clínicas	Tipo molecular	Frequência de genótipos encontrada						
				<i>C. neoformans</i> VNI	<i>C. neoformans</i> VNII	<i>C. neoformans</i> VNIV	<i>C. gattii</i> VGI	<i>C. gattii</i> VGII	<i>C. gattii</i> VGIII	<i>C. neoformans</i> VNB
Barião et al., 2020	Ribeirão Preto - SP	72	URA5 RFLP	61	3	0	0	8	0	0
Vilas-Boas et al., 2020	Uberaba - MG	23	MLST, URA5 RFLP	0	0	0	1	22	0	0
Ponzio et al., 2019	São Paulo - SP	59	MLST	40	9	0	0	6	0	4
Wirth et al., 2018	Porto Alegre - RS	13	URA5 RFLP	2	9	0	0	2	0	0
Herkert et al., 2018	SP, MG, PR	191	AFLP fingerprinting	172	19	0	0	0	0	0
Andrade-Silva et al., 2018	Uberaba - MG	63	MLST, URA5 RFLP	57	4	2	0	0	0	0
Nunes et al., 2018	MS	129	URA5 RFLP	115	5	0	0	9	0	0
Aguiar et al., 2017	Uberlândia - MG	41	URA5 RFLP	40	0	0	1	0	0	0
Figueiredo et al., 2016	Ribeirão Preto - SP	20	PCR fingerprint	10	3	0	0	5	2	0
Favaleza et al., 2014	Cuiabá - MT	27	URA5 RFLP, PCR fingerprint	16	0	0	0	11	0	0
Tsujisaki et al., 2013	Campo Grande - MS	48	URA5 RFLP	45	2	0	0	1	0	0
Matos et al., 2012	Bahia - BA	62	URA5 RFLP	48	1	0	0	13	0	0
Khell Da Silva et al., 2012	Amazonas - AM	40	URA5 RFLP	31	0	0	0	9	0	0
Martins et al., 2011	Teresina - PI	63	URA5 RFLP, PCR fingerprint	37	1	0	1	24	0	0
Freire et al., 2011	Amazonas	57	URA5 RFLP, PCR fingerprint	39	1	0	0	17	0	0
Mora et al., 2010	Uberaba - MG	81	URA5 RFLP	76	0	0	0	5	0	0
Sousa et al., 2010	Goiânia - GO	84	PCR fingerprint	80	0	0	0	0	4	0
Santos et al., 2008	Belém - PA	43	URA5 RFLP, PCR fingerprint	22	0	0	1	20	0	0
Igreja et al., 2004	Rio de Janeiro - RJ	88	PCR fingerprint RAPD	73	12	0	1	2	0	0
Total de tipos moleculares em amostras clínicas				80,07%	5,73%	0,17%	0,42%	12,79%	0,50%	0,33%
AM, Amazonas; BA, Bahia; GO, Goiânia; MG, Minas Gerais; MS, Mato Grosso do Sul; PA, Pará; PE, Pernambuco; PI, Piauí; PR, Paraná; RS, Rio Grande do Sul; RR, Roraima; SP, São Paulo				1204						

Fonte: Elaborado pelo autor.

Primeiramente, considerava-se que a distribuição global de *C. neoformans* ocorria em solo contaminado por fezes de pombos, enquanto *C. gattii* seria um micro-organismo presente em locais de clima tropical e subtropical, particularmente em áreas colonizadas por eucaliptos. No entanto, infecções causadas por *C. gattii* fora de áreas tropicais e subtropicais, incluindo a Europa e Austrália, tem sido relatada desde a década de 1980. A partir do surto criptocócico na Ilha de Vancouver, que afetou animais terrestres, mamíferos marinhos e seres humanos (Stephen et al., 2002), a ocorrência de *C. gattii* em locais de climas diversos, como o temperado de Vancouver, foi trazida para o centro das atenções. Desde então, outros estudos esclareceram essa questão, mostrando uma distribuição mais ampla dos nichos ecológicos de *Cryptococcus* (Spina-Tensini et al., 2017).

O conhecimento sobre taxonomia, epidemiologia e distribuição global do complexo de espécies *C. neoformans/C. gattii* expandiu-se nos últimos anos. O Brasil é um dos países onde o meio ambiente tem sido mais pesquisado depois dos EUA. Desta forma, muitos pesquisadores destacaram sua ocorrência em meio urbano, mas poucos deles estudaram a correlação entre os nichos do complexo de espécie *C. neoformans/C. gattii* e casos de meningite criptocócica na mesma região (Spina-Tensini et al., 2017).

Cryptococcus spp. é capaz de se adaptar rápida e efetivamente a condições variadas, favorecendo sua sobrevivência no ambiente e no hospedeiro infectado. O estabelecimento da infecção e disseminação de *Cryptococcus* spp. no hospedeiro humano (principalmente no cérebro) é favorecido por diferentes fatores de virulência fúngica associados a suscetibilidade do hospedeiro (Del Poeta, 2004). Dentre essas características, a cápsula polissacarídica constitui um importante fator de virulência que confere maior resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro (Monari et al., 2006), aos agentes antifúngicos e tem participação ativa na formação de biofilmes (Martinez, Casadevall, 2006).

Cryptococcus spp. possui múltiplos fatores de virulência que são responsáveis por sua invasão tecidual como cápsula, produção de melanina, capacidade de sobrevivência a 37°C e produção de enzimas, cujas principais são lacase, fosfolipase e urease. A secreção de enzimas é crucial para a degradação das proteínas do hospedeiro (Alspaugh, 2015; Barcellos et al.,

2018; Casadevall et al., 2000; Oliveira et al., 2010). Embora as espécies patogênicas de *Cryptococcus* apresentem esses recursos, existem diferenças importantes entre elas que podem influenciar em sua virulência (Barcellos et al., 2018; Bielska, May, 2016; O'Meara, Andrew Alspaugh, 2012).

A cápsula polissacarídica que envolve a espessa parede celular é um importante fator de virulência. Essa estrutura é composta por dois polímeros, glucuronoxilomanano (GXM) e glucuronoxilomanogalactano (GXMGal), juntamente com manoproteínas. O principal polissacarídeo capsular é o glucuronoxilomanano (GXM), que é composto de uma estrutura de manose com substituições de xilose e ácido glucurônico (Cherniak, Sundstrom, 1994). A GXM é abundantemente secretada em fluidos de cultura e tecidos infectados (Barcellos et al., 2018; Buchanan, Murphy, 1998). Acredita-se que as formas secretadas e associadas à superfície de GXM modulam a resposta imune durante a criptococose por meio de múltiplos mecanismos. O GXM é reconhecido por diversas células efetoras naturais como neutrófilos, monócitos, macrófagos e células dendríticas, influenciando a resposta imune contra *C. neoformans*. O polissacarídeo capsular é secretado para a matrix extracelular, onde induz paralisia imunológica por meio de diferentes mecanismos (Ellerbroek et al., 2002; Murphy, Cozad, 1972). Além disso, a administração de anticorpos monoclonais (MAbs) contra GXM pode modificar o curso da criptococose experimental, prolongando a sobrevivência do hospedeiro (Monari et al., 2006).

O tamanho da cápsula pode variar de indetectável a 30 µm de espessura, dependendo de condições ambientais como alta concentração de CO₂ e baixo teor de ferro (Zaragoza, Casadevall, 2004). Quando as cepas são recuperadas do meio ambiente, as cápsulas são pequenas, com tamanhos entre 2 a 4µm. Durante a infecção em mamíferos, o tamanho da cápsula aumenta dramaticamente e acredita-se que esse fenômeno seja necessário para a patogênese criptocócica. Provavelmente, a alteração na espessura da cápsula é mediada no nível de síntese das moléculas de polissacarídeos (Reese et al., 2007).

A acidificação fagossômica é um mecanismo celular crítico para a inibição e morte de micro-organismos durante a fagocitose. A acidez associada às proteínas microbicidas cria um ambiente desfavorável para o crescimento de

muitos micro-organismos. Consequentemente, numerosos patógenos desenvolveram estratégias para combater a acidificação fagossômica através de vários mecanismos que incluem a interferência na maturação dos fagossomos. *Cryptococcus neoformans* resiste a fagossomos ácidos após a ingestão por macrófagos, o que propicia um ambiente favorável à replicação, uma vez que o fungo possui a capacidade de se replicar em pH ácido. Os resíduos de ácido glucurônico presentes no polissacarídeo capsular de *C. neoformans* podem tamponar a acidificação fagossômica. A interferência com a acidificação fagossômica representa uma nova função para a cápsula criptocócica na virulência (De Leon-Rodriguez et al., 2018).

Outro fator importante em relação à virulência do *Cryptococcus* é a produção de melanina a partir da atividade da enzima lacase. A lacase é uma enzima que oxida substratos difenólicos (poliaminobenzenos oxidantes e compostos mono ou polifenólicos) para formar polímeros longos de melanina (Firacative et al., 2018; Sibiiti et al., 2014). A atividade difenil oxidase é encontrada em cepas produtoras de melanina e está ausente em cepas deficientes em melanina de *C. neoformans*. O gene *LAC1* codifica a enzima lacase (Pukkila-Worley et al., 2005; Williamson, 1994).

A melanina é composta por um grupo de pigmentos escuros e antioxidantes presentes em algumas espécies de fungos. Sua importância em infecções por *Cryptococcus* spp. tem sido extensivamente estudada e sua correlação com a virulência estabelecida (Pukkila-Worley et al., 2005). A capacidade de formação de melanina na presença de compostos difenólicos tem desempenhado um papel fundamental na patogenicidade do *Cryptococcus*, que inclui a eliminação de radicais livres (efeito antioxidante), termo-tolerância (proteção contra estresse térmico e frio), sequestro de íons metálicos, desenvolvimento celular e força celular mecânico-química. Essas propriedades protegem a levedura de uma variedade de condições ambientais e mecanismos efetores do hospedeiro, além de influenciar a suscetibilidade a agentes antifúngicos (Cordero, Casadevall, 2017; Eisenman et al., 2014; Grossman, Casadevall, 2017; Thammasit et al., 2018).

Cryptococcus são ainda capazes de formar biofilmes, que são comunidades de micro-organismos envolvidas em uma matriz extracelular por eles produzida e aderidas a uma superfície abiótica ou biótica, cujo

desenvolvimento proporciona benefícios importantes para os micro-organismos (Donlan, 2002). O componente polissacarídico GXM da cápsula de *Cryptococcus* spp. é muito importante para a fase inicial de adesão do biofilme, constituindo o principal componente da matriz extracelular (Martinez, Casadevall, 2007).

Os biofilmes geram barreiras físicas que proporcionam proteção contra fatores externos (Donlan, 2002). A matriz polimérica promove a adsorção de moléculas de nutrientes e fornece proteção contra agressões ambientais como alterações de pH, concentração de sal, desidratação, produtos químicos agressivos, bactericidas, antibióticos, predadores, bactérias líticas e metais pesados. Assim, os micro-organismos do biofilme diferem profundamente das células planctônicas (Tavares et al., 2019). Células de *C. neoformans* e *C. gattii* se mostraram mais virulentas nas formas de biofilme do que as células planctônicas quando estudadas em modelo de *Galleria mellonella*. Isso sugere que as condições do biofilme podem contribuir para o perfil de virulência nessas larvas (Benaducci et al., 2016).

A comunicação celular no biofilme se dá por meio de sinalizações denominadas quorum sensing (Donlan, 2002). Em densidades populacionais suficientes, esses sinais atingem as concentrações necessárias para a ativação dos genes envolvidos na diferenciação do biofilme (Römling, Balsalobre, 2012). Benaducci et al. (2016) verificaram significativo aumento na expressão dos genes *LAC1*, *URE1* e *CAP59* quando comparados os biofilmes e células planctônicas de *Cryptococcus* spp. Diferenças no transcriptoma de biofilme de *C. gattii* em superfície abiótica também já foram relatadas (Tavares et al., 2019).

O diagnóstico precoce da criptococose e instituição de terapia adequada são imperativos para minimizar a severidade da infecção. A meningite criptocócica pode ser tratada com eficácia com medicamentos como a anfotericina B e a flucitosina, mas eles são pouco adequados para uso em países em desenvolvimento. A anfotericina B tem alto custo e requer administração hospitalar, e a flucitosina requer monitoramento sanguíneo cuidadoso. Desta forma, a meningite criptocócica em países em desenvolvimento tem sido geralmente tratada com fluconazol, que é parcialmente eficaz (Mourad, Perfect, 2018). Os isolados clínicos de *C.*

neoformans foram relatados como menos suscetíveis a drogas antifúngicas do que os isolados ambientais (Matos et al., 2012). Embora a contribuição desses estudos seja de grande importância, mais trabalhos precisam ser feitos para ter dados suficientes para uma análise especialmente de correlação entre a fonte dos isolados, clínica ou ambiental, e seus perfis de susceptibilidade antifúngica (Firacative et al., 2018).

Existem diferentes métodos usados para o diagnóstico de criptococose sendo eles baseados na demonstração direta do patógeno, na cultura e identificação microbiológica, na histopatologia de tecidos infectados e nos métodos sorológicos e moleculares. A detecção do antígeno do polissacarídeo capsular de *Cryptococcus* spp. no soro, urina e no líquido tem sido bastante utilizada, sendo um dos principais testes sorológicos realizados na rotina micológica. A detecção desse antígeno envolve diferentes técnicas como Imunoensaio Enzimático (EIA), Aglutinação de partículas de Látex e Imunocromatografia por Lateral-Flow-Assay (CrAg LFA). Métodos moleculares, embora disponíveis e amplamente utilizados para fins de pesquisa, não são utilizados em larga escala na rotina clínica (Maziars, Perfect, 2016).

Métodos microscópicos e de cultura microbiológica, embora específicos, mostram uma sensibilidade de 50-80%. Somado a esse fator limitante, a cultura leva tempo e requer mais trabalho do que as outras metodologias, além de grandes volumes de amostras. A metodologia de aglutinação em látex utiliza partículas de látex revestidas com anticorpos policlonais para a cápsula criptocócica. Ela é mais sensível do que os métodos anteriores, mas sofre com a limitação da falsa positividade bem como altas taxas de falsa negatividade. A subjetividade da leitura e graduação das reações de látex são problemas adicionais, especialmente em casos limítrofes. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) oferece uma excelente alternativa ao diagnóstico precoce da criptococose se comparada aos métodos tradicionais, sendo rápida e específica, detectando baixa carga fúngica e utilizando pequena quantidade de amostra (Saha et al., 2009).

O tipo da amostra biológica a ser utilizada para o diagnóstico clínico deve ser adequado à metodologia adotada. Saha et al. (2009) demonstraram que para pacientes pré-tratamento, com métodos microbiológicos convencionais de diagnóstico, o líquido (LCR) foi a melhor amostra para o

diagnóstico laboratorial de criptococose e a urina não demonstrou ser um material muito bom. No entanto, a urina provou ser uma amostra de boa qualidade para detecção por metodologias de latex, EIA e PCR, com altas sensibilidades dos ensaios. A urina, por ser obtida de forma não invasiva e de fácil coleta, é uma amostra biológica interessante para a detecção de *Cryptococcus* por esses métodos. Nesse estudo ainda, amostras de soro de pacientes pré-tratamento apresentaram positividade de 100% quando diagnosticadas pelas metodologias de microscopia, cultura microbiológica, latex, EIA e PCR, mas isso decaiu para 94% em amostras de soro de pacientes após o início da terapia, quando se utilizou as metodologias de latex, EIA e PCR (Saha et al., 2009).

Diferentes técnicas moleculares têm sido utilizadas para determinar o genótipo de isolados individuais, e comparar grupos de isolados entre espécies de *C. neoformans* e *C. gattii*, e ainda realizar estudos de epidemiologia molecular e genética de populações. Metodologias como PCR e Nested-PCR (Tanaka et al., 1996), PCR Multiplex (Luo, Mitchell, 2002), PCR Singleplex (Feng et al., 2013), AFLP Fingerprinting (Bovers et al., 2006; Herkert et al., 2018), RFLP (Andrade-Silva et al., 2018), PCR com imunocromatografia de fluxo lateral (Ma et al., 2012), MALDI-TOF MS (Siqueira et al., 2019), dentre outras, tem sido utilizadas para detecção de alvos de *Cryptococcus* spp. como os genes *URA5*, Laccase, *RUM1*, *CAP59*, *STR* e *ITS* - *Internal transcribed space* (região espaço interno transcrito). A tipagem molecular baseada na diferença de introns do gene *STR1* de *Cryptococcus* mostrou que as perdas e consequentes diferenças de tamanhos desses introns possibilitam a diferenciação do complexo de espécies de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (Feng et al., 2013).

Desde a introdução do conceito dos 3Rs (do inglês *Replacement*, *Reduction* e *Refinement*), formulado por William Russell e Rex Burch em 1959, princípios éticos para uso de animais com fins de pesquisas tem sido cada vez mais considerados (Hubrecht, Carter, 2019). Nessa ótica, a crescente utilização de modelos invertebrados tem contribuído com a substituição de animais superiores vivos e conscientes (*Replacement*); a redução do número de animais utilizados para obter informações em determinada quantidade e precisão (*Reduction*); e o refinamento da pesquisa, diminuindo a severidade de

procedimentos aplicados em animais sencientes, que ainda precisem ser usados (*Refinement*) (Hubrecht, Carter, 2019).

Diferentes modelos de animais alternativos têm sido propostos para o estudo da patogenicidade de *Cryptococcus* e para o desenvolvimento de novas opções de tratamento (Sabiiti et al., 2012). Modelos de invertebrados, como *Galleria mellonella*, *Acantamoeba castellanii*, *Dictyostelium discoideum*, *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*, tem sido largamente utilizado por apresentarem algumas vantagens em infecção experimental quando comparados aos mamíferos. As principais vantagens são o baixo custo para manutenção, o trabalho sem necessidade de aprovação por comitê de ética, o rápido tempo de reprodução dos invertebrados, a possibilidade de estudos em larga escala e principalmente de estudos envolvendo imunidade inata, uma vez que os invertebrados possuem apenas o sistema inato (Arvanitis et al., 2013; Junqueira, 2012).

Mylonakis et al. (2010) avaliaram a sobrevida de *Galleria mellonella* após inoculação de sua hemolinfa com diferentes cepas de *Cryptococcus neoformans* e mostraram que esta levedura é capaz de causar infecção nas larvas tanto a 30°C quanto a 37°C. Observaram ainda que os genes *CAP59*, *GPA1*, *RAS1* e *PKA1*, envolvidos na virulência de *C. neoformans* em mamíferos, também eram expressos em *Galleria mellonella* e, desta forma, a correlação positiva entre o modelo invertebrado e vertebrado poderia ser estabelecida (Arvanitis et al., 2013; Fuchs et al., 2010). O modelo de *Galleria mellonella* também se mostrou apropriado para o estudo de suscetibilidade aos antifúngicos. A droga administrada na hemolinfa das larvas, após a inoculação com *C. neoformans*, foi eficaz para prolongar a sobrevida e diminuir a carga fúngica (Fuchs et al., 2010). Além disso, alterações morfológicas como aumento capsular e formação de células gigantes, descritos em modelos de camundongos, também foram observadas em *G. mellonella* infectada por *C. neoformans* (García-Rodas et al., 2011; Zaragoza et al., 2010; Zaragoza, Nielsen, 2013).

Apesar da disseminação mundial da criptococose, poucos dados epidemiológicos estão disponíveis a respeito dessa micose no Brasil. Até esse momento, estudos sobre a caracterização genotípica de seu agente etiológico não foram relatados na região do Vale do Paraíba, São Paulo. Desta forma,

esse estudo tem por finalidade caracterizar amostras clínicas de *Cryptococcus* spp. provenientes de hospitais da cidade de São José dos Campos - SP por técnicas de biologia molecular e por ensaios *in vitro* e *in vivo* em modelo de *Galleria mellonella*.

2 PROPOSIÇÃO

Esta pesquisa se propõe a caracterizar genotipicamente e avaliar o perfil de virulência *in vitro* e em modelo de *Galleria mellonella* de amostras clínicas de pacientes com criptococose, tratados em hospitais na cidade de São José dos Campos.

2.1 Objetivos específicos

- a. identificar as espécies de cepas clínicas do gênero *Cryptococcus* através da Reação em Cadeia da Polimerase;
- b. determinar a sensibilidade *in vitro* das cepas clínicas de *Cryptococcus* spp. aos antifúngicos anfotericina B e fluconazol;
- c. avaliar a capacidade de formação de biofilme *in vitro* pelas cepas clínicas estudadas;
- d. avaliar o perfil de virulência das cepas clínicas de *Cryptococcus* spp. em modelo *in vivo* de *Galleria mellonella*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem das cepas e condições de cultivo

Nesse estudo foram avaliadas sete cepas clínicas isoladas de pacientes com culturas positivas para *Cryptococcus* spp., cedidas pelo Laboratório de Análises Clínicas LabviValle Ltda, Laboratório ValeClin e Hospital de Clínica Sul Dr. Ivan da Silva, localizados no município de São José dos Campos. As amostras foram coletadas no período de julho de 2019 a março de 2020 e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em humanos (CEPh), sob o parecer 3.641.351 (Anexo A).

Foram também incluídas cepas de referência ATCC (American Type Culture Collection) para a validação de todos os ensaios, quais sejam: ATCC 208821, caracterizada como *Cryptococcus neoformans* var. *grubbi*, sorotipo A (H99) e ATCC 56990, caracterizada como *Cryptococcus gattii*, sorotipo BC, tipo molecular VGIII. A cepa ATCC 6258, *Candida krusei*, foi utilizada como cepa controle nos testes de microdiluição em caldo. Estas cepas são mantidas congeladas no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Bucal do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista (ICT/UNESP) de São José dos Campos-SP.

Os micro-organismos foram cultivados em caldo de ágar Sabouraud dextrose (Becton Dickinson), com agitação (150 rpm), previamente aos ensaios. *C. neoformans* e *C. gattii* foram incubados por 48 h a 30 °C e *C. krusei* por 24 h a 37°C. Durante os ensaios, as incubações foram realizadas a 37 °C para todos os micro-organismos.

3.2. Identificação de *Cryptococcus* spp. por métodos microbiológicos clássicos

As cepas foram semeadas em ágar Sabouraud (Becton Dickinson) e incubadas a 37 °C por 48 h. Para avaliação da produção de melanina, os isolados foram simultaneamente cultivados em ágar semente de niger, *Guizotia abyssinica*, (sementes de niger 10g, glicose 0,1g, ágar bacteriológico 2g e água qsp 100mL). A produção de melanina foi avaliada através da reação da fenol-oxidase de *C. neoformans* e *C. gattii* com o ácido cafeico das sementes de niger, produzindo um pigmento castanho escuro nas colônias 48 h após a incubação a 37 °C (Klein et al., 2009).

A avaliação da presença de cápsula para diferenciação preliminar de *Cryptococcus* spp. de outras leveduras foi feita à partir de coloração por tinta da China (Nanquim Acrilex). Uma colônia foi coletada a partir do ágar Sabouraud e corada com 5µL do corante e observada ao microscópio óptico entre lâmina e lamínula. A cápsula foi identificada como um halo transparente ao redor dos micro-organismos contra um fundo preto.

3.3 Caracterização dos isolados por biologia molecular

Os isolados foram caracterizados molecularmente por PCR *singleplex* conforme metodologia proposta por Feng et al. (2013) .

3.3.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada com kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega Corporation, Madison, WI), conforme orientações do fabricante. O protocolo de extração de DNA deste estudo considerou o pré tratamento das amostras com a enzima liticase (Sigma Cat.3 I2524), que

catalisa a lise da célula fúngica por uma atividade específica de protease alcalina sobre o beta glucano β -1,3-glucanase da parede celular.

Inicialmente, as amostras foram cultivadas em caldo ágar Sabouraud dextrose, conforme descrito no item 3.1. O tubo foi centrifugado a 13.000 x *g* por 2 minutos para precipitação das células e o sobrenadante foi removido. O precipitado foi lavado por duas vezes com PBS sob centrifugação. A seguir, 1 mL de cada crescimento foi coletado e transferido para um microtubo de 1,5 mL. As células foram ressuspensas em 293 μ L de 50 mM EDTA e adicionados 7,5 μ L de liticase, em concentração de 75 U/ μ L. O conjunto foi incubado a 37 °C por 3 h para digestão da parede celular. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 13.000 x *g* por 2 minutos e o sobrenadante removido. Adicionou-se 300 μ L da solução de lise ao precipitado, 100 μ L da solução de precipitação de proteínas e o tubo foi homogeneizado vigorosamente em vórtex por 20 segundos. As amostras foram colocadas em banho de gelo por 5 minutos e centrifugadas novamente a 13.000 x *g* por 3 minutos. O sobrenadante foi coletado, transferido para um novo microtubo de 1,5 mL contendo 300 μ L de isopropanol em TA (temperatura ambiente) e homogeneizado gentilmente por inversão. A amostra foi centrifugada a 13.000 x *g* por 2 minutos e o sobrenadante removido. Adicionou-se 300 μ L de etanol a 70% e o tubo foi homogeneizado por inversão para lavar o sedimento de DNA. A amostra foi centrifugada a 13.000 x *g* por 2 minutos e o sobrenadante removido. Os microtubos foram colocados abertos e invertidos sobre papel absorvente por 15 minutos. O DNA foi ressuspenso em 25 μ L de solução de eluição, incubado a 65 °C por 10 minutos e estocado a – 80 °C.

3.3.2 Quantificação do DNA extraído

Após o procedimento de extração, as concentrações das amostras de DNA foram quantificadas em ng/ μ L por espectrofotometria no comprimento de onda de 260 nm para DNA e 280 nm para proteínas, e a pureza do material extraído foi observada usando a relação densidade ótica (DO) 260/280, em equipamento NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). Para

uma amostra de DNA ser considerada pura, a razão 260/280 deve variar entre 1,8 e 2,0. Se essa razão for $< 1,8$, possivelmente há contaminação com proteínas, fenol ou outros compostos que absorvem fortemente em 280 nm (Palma et al., 2004; Lehninger, 2018).

3.3.3 Identificação molecular por PCR *singleplex*

O método de PCR *singleplex* utilizado para a identificação das espécies de *Cryptococcus* spp. foi baseado em protocolo descrito por Feng et al. (2013). Os iniciadores utilizados foram construídos para flanquear a região do gene transportador de açúcar *STR1*. Diferentes perdas de íntrons nessa região ocorrem entre as espécies de *Cryptococcus*, o que possibilita o seu uso como marcador genético para tipagem molecular. Os iniciadores utilizados foram: *STR1-F* (5' GAGATTCGGCAGGAAGAAGC 3') e *STR1-R* (5' CGTAAGGGATGACGAAAAGGTA 3'). A utilização destes iniciadores possibilita a formação de produtos de amplificação de 274 pb para *C. neoformans* var. *grubii*, 224 pb para *C. neoformans* var. *neoformans* e 170 pb para *C. gattii*. Amplificações simultâneas de dois fragmentos também são possíveis para identificação dos híbridos AD (274 e 224 pb), AB (274 pb e 170 pb) e BD (224 e 170 pb).

A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25 μ L contendo 20 ng de DNA, 10mM Tris HCl pH 8,3/50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,8 mM de desoxirribonucleotídeos (dNTPs), 0,2 μ L de cada iniciador (10 μ M) e 1U de Taq DNA platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA) em um termociclador Mastercycler® gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). As condições para a realização deste PCR foram: desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 30 segundos e extensão final de 72 °C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1,5% em TBE, corados com 0,5 μ g/mL de brometo de etídio e visualizados em um transiluminador UV (DyNA Light, LABNET, EUA).

Em todas as reações foram utilizados DNA molde das cepas referências ATCC 56990 e ATCC 208821 (H99) como controles positivos da reação e um controle negativo (sem adição de DNA molde).

3.4. Caracterização das amostras clínicas *in vitro*

3.4.1 Avaliação da atividade antifúngica e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O teste de sensibilidade foi realizado pela técnica de microdiluição de acordo com European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (Arendrup et al., 2017). Os ensaios foram realizados em placas de poliestireno de 96 poços com utilização do meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 2% de glicose. Foram avaliadas as sensibilidades dos isolados clínicos para os antifúngicos anfotericina B (AMB) e fluconazol. A levedura *Candida krusei* ATCC 6258 foi utilizada como controle do experimento, conforme protocolo do EUCAST (Committee et al., 2020). A figura 2 traz a representação esquemática do teste de microdiluição em caldo para leveduras.

Os fármacos foram reconstituídos com o solvente dimetilsulfóxido (DMSO) e posteriormente diluídos em meio de cultura RPMI suplementado com 2% de glicose. As concentrações avaliadas foram de 0,0625 µg/mL - 32 µg/mL para fluconazol e de 0,0313 µg/mL - 16 µg/mL para AMB. O volume de 100 µL de cada concentração dos fármacos foi adicionado a um poço da placa. As concentrações finais podem ser observadas no quadro 3.

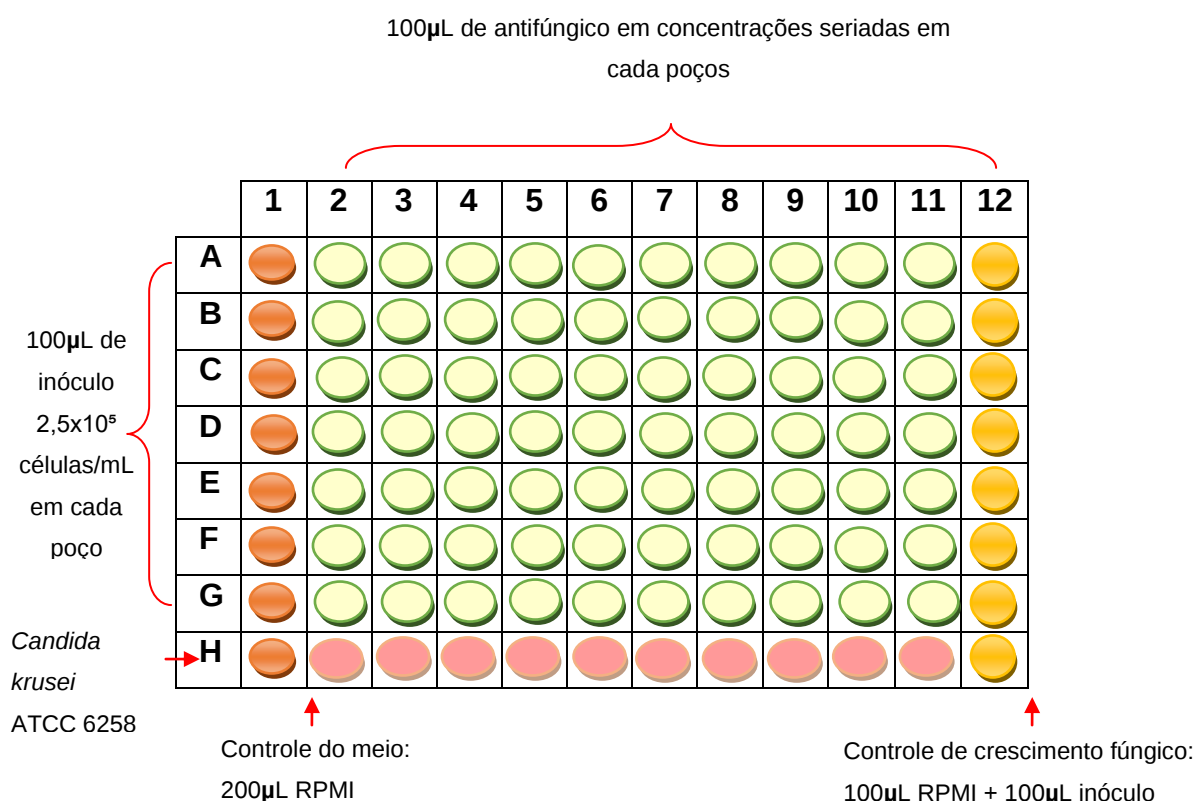
Quadro 3 - Faixas de concentrações de antifúngicos ($\mu\text{g/mL}$) apropriadas para teste de microdiluição em caldo (EUCAST)

Antifúngicos	Diluições seriadas dos Antifúngicos ($\mu\text{g/mL}$)									
Fluconazol	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625
AMB	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0313

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após as diluições dos fármacos, as suspensões de leveduras cultivadas em caldo ágar Sabouraud dextrose, conforme descrito no item 3.1, foram coletadas por centrifugação a 5.000 rpm por 10 minutos, lavadas três vezes com tampão fosfato-salino (PBS), padronizadas em $2,5 \times 10^5$ células/mL com auxílio de câmara de Neubauer e preparadas em RPMI 1640 (com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e acrescido de 2% de glicose) tamponado com MOPS 0,165 M, pH 7,0. Foram acrescentados 100 μL de inóculo $2,5 \times 10^5$ células/mL nos poços da placa de 96 poços, a qual foi incubada em a 37 °C sob agitação (60 rpm) por 48 horas. A diluição 1:1 com a suspensão do inóculo fornece concentrações finais dos princípios ativos estudados que são a metade das indicadas. Um poço com 100 μL de inóculo e 100 μL de RPMI foi utilizada como controle livre de drogas e o controle negativo do ensaio foi feito em outro poço com 200 μL de RPMI.

Figura 2 - Etapas do teste de micro-diluição em caldo segundo metodologia padronizada para leveduras pelo EUCAST (2017)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados foram analisados por leitura visual e espectrométrica a 530 nanômetros (nm) após o período de incubação. A concentração inibitória mínima (CIM) da anfotericina B foi determinada pela menor concentração capaz de inibir o crescimento dos fungos em $\geq 90\%$ quando comparado ao controle de crescimento fúngico. Já a CIM do fluconazol foi considerada a concentração mais baixa da droga que inibiu o crescimento $\geq 50\%$ (Arendrup et al., 2017). Os experimentos foram realizados em duplicata.

De acordo com as normas do EUCAST, versão 1.0, atualizadas em 2020, o valor de corte epidemiológico (ECOFF) proposto para *C. neoformans*, em relação a AMB é 1 ug/mL (sensível ≤ 1 ug/mL e resistente > 1 ug/mL). Já para o *C. gattii*, o valor do ECOFF, considerando o mesmo antifúngico, é 0,5 ug/mL. Não há valor de corte epidemiológico estabelecido para fluconazol.

3.4.2 Análise da formação do biofilme

Os biofilmes foram formados de acordo com Martinez, Casadevall, 2006, com algumas modificações (Martinez, Casadevall, 2006). A suspensão fúngica foi preparada conforme descrito no item 3.1 e, após o período de incubação, as células foram coletadas por centrifugação de 5000 rpm por 10 minutos e lavadas três vezes com PBS. A concentração de 1×10^8 células/mL foi padronizada com o auxílio da câmara de Neubauer e preparada em meio RPMI 1640 acrescido de 2% de glicose e tamponado com MOPS 0,165 M, pH 7,0. Para cada cepa, 100 µL da suspensão foram adicionadas a 8 poços de poliestireno individuais em placas de 96 poços e foram incubadas a 37 °C sem agitação por 4 horas para o estágio inicial de adesão. Em seguida o meio RPMI dos poços foi trocado e as placas foram incubadas novamente por 48 horas. A cada 24 horas ocorreu troca do meio de cultura para manter os nutrientes necessários para as células. Poços sem células de *Cryptococcus* spp. foram utilizados como controle.

Após a incubação, os poços foram lavados três vezes com PBS para a remoção de leveduras não aderentes. As células fúngicas que permaneceram aderidas à superfície plástica foram consideradas componentes dos biofilmes (Martinez, Casadevall, 2006).

3.4.2.1 Avaliação da formação da biomassa total por cristal violeta

A quantificação dos biofilmes por cristal violeta foi realizada de acordo com Peeters et al. (2008). Após a formação do biofilme, 100 µL de metanol absoluto foi adicionado à cada poço para fixação dos biofilmes e o conjunto incubado por 15 minutos. Em seguida, o metanol foi removido e a placa incubada em temperatura ambiente para secar por aproximadamente 16 horas. Cem microlitros de solução de cristal violeta a 0,5% foram adicionados em cada poço e, após 20 minutos, o corante foi removido e os poços lavados com

PBS. Em seguida, 150 µL de ácido acético 33% (v/v) foi adicionado para a solubilização do corante. As placas foram lidas a 570 nm.

3.4.2.2 Avaliação da viabilidade celular por 2,3-Bis- (2-Metoxi-4-Nitro-5-Sulfofenil) -2H-Tetrazolium-5-Carboxanilida (XTT)

A atividade metabólica dos biofilmes foi avaliada de acordo com Martinez, Casadevall (2006). Medidas semi-quantitativas das atividades dos biofilmes foram obtidas a partir do ensaio de redução de XTT. A atividade celular é demonstrada quando a enzima mitocondrial desidrogenase reduz o sal XTT tetrazólio a sal formazan, com alteração colorimétrica. O ensaio foi realizado com adição em cada poço de 50 µL de solução de XTT (1 mg / mL em PBS) e 4 µL de uma solução de menadiona (1 mM em acetona, Sigma Chemical Co). As microplacas foram incubadas a 37 °C por 5 horas e medidas as absorbâncias em 590 nm. Em todas os testes, o RPMI foi incluído como controle negativo.

3.5. Caracterização dos isolados clínicos *in vivo* em modelo de *Galleria mellonella*

3.5.1 Cultura das larvas de *Galleria mellonella* e condições experimentais

As larvas de *Galleria mellonella* utilizadas neste estudo foram obtidas após a oviposição de mariposas adultas criadas e mantidas a 25 °C no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Bucal do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista (ICT/UNESP) de São José dos Campos-SP (Jorjão et al., 2018). No dia anterior ao experimento, vinte larvas por grupo avaliado, com tamanhos semelhantes (250 a 300 mg), foram

selecionadas e armazenadas em placas plásticas de Petri de 90 mm, a 37 °C, protegidas da luz e sem alimento.

3.5.2 Determinação da virulência por curva de sobrevivência

As cepas clínicas foram previamente cultivadas em caldo Sabouraud dextrose conforme descrito no item 3.1. Com auxílio de câmara de Neubauer, inóculos de 2×10^8 células/mL de cada grupo avaliado foram preparados em PBS.

Vinte larvas por grupo foram infectadas com 10 µL de inóculos injetados no último proleg com seringa de Hamilton (Hamilton, EUA) (Mylonakis et al., 2005). Os grupos de *G. mellonella* foram incubados a 37 °C, e sua sobrevivência foi monitorada a cada 24 horas por 7 dias. A morte das larvas foi avaliada pela falta de movimento após tocá-las com uma pinça. Os resultados foram expressos em porcentagem de sobrevivência de larvas. O procedimento foi feito em duplicata.

Um grupo de 20 larvas foi inoculado com PBS para monitorar os efeitos potenciais na sobrevivência devido a lesão física, enquanto outro grupo de 20 larvas não inoculadas funcionaram como controle não tratado (Fircative et al., 2014).

3.5.3 Avaliação do índice de saúde em *Galleria mellonella*

O índice de saúde de *Galleria mellonella* foi avaliado conforme padrões estabelecidos por Loh et al. (2013). Após a infecção, as larvas foram monitoradas, a cada 24 horas por 7 dias, quanto aos seguintes atributos de saúde: mobilidade, extensão da produção de seda (formação de casulos), melanização e sobrevivência. A melanização progressiva das larvas depende do patógeno infectante (Fuchs et al., 2010). Alguns patógenos causam melanização profunda e uniforme, enquanto outros causam mudanças de cor

mais sutis. A melanização é uma resposta imune primária à infecção em larvas de *G. mellonella* e dá uma indicação da gravidade da infecção (Kavanagh, Reeves, 2004). A incapacidade das larvas em estágio de pupa de formar um casulo, bem como a alteração da motilidade, indica problemas de saúde. Foi fornecida uma pontuação para cada atributo que contribuiu para um índice geral de saúde de uma larva individual. Uma larva saudável e não infectada costuma pontuar entre 9 e 10, enquanto a morta e infectada costuma pontuar 0 (Loh et al., 2013). Os critérios de avaliação e suas respectivas pontuações são expostos no quadro 4.

Quadro 4 – Escala de pontuação de índice de saúde de *Galleria mellonella*

Categoria	Descrição	Pontuação
Mobilidade	Imóvel	0
	Mínima mobilidade ao estímulo	1
	Mobilidade quando estimulado	2
Formação de casulo	Casulo ausente	0
	Formação parcial	0,5
	Formação completa	3
Melanização	Melanização completa (preta)	0
	Manchas marrons	1
	> 3 manchas beges	2
	< 3 manchas beges	3
	Sem melanização	4
Sobrevida	Vivo	2
	Morto	0

Fonte: Loh et al., 2013.

3.5.4. Avaliação dos tamanhos da cápsula e corpo de *Cryptococcus* spp. após inoculação em *Galleria mellonella*

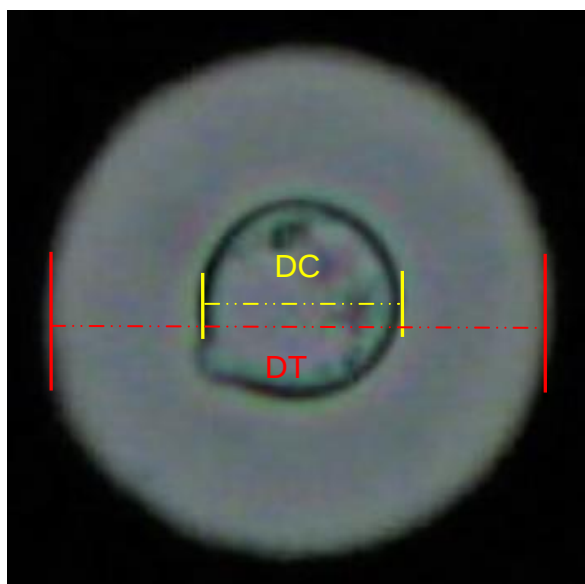
As cepas de *Cryptococcus* spp. foram cultivadas conforme descrito no item 3.1 para avaliação do diâmetro do corpo celular e da cápsula. A cápsula foi identificada como um halo ao redor das células e o tamanho das células

cultivadas em Sabouraud foi considerado o tempo zero para a infecção. Dez microlitros de uma suspensão saturada de células foram corados por 5 µL de tinta da China (Nanquim Acrilex) e observados ao microscópio óptico entre lâmina e lamínula.

Para a análise dos tamanhos do corpo celular e da cápsula de *Cryptococcus* spp após inoculação em *G. mellonella*, foram isoladas células fúngicas em macerados de larvas 72 horas após infecção. Cada larva foi morta e macerada com bisturi estéril em placa de Petri, homogeneizada em 1 ml de PBS. Dez microlitros do macerado foram corados com 5 µL de tinta da China (Nanquim Acrilex) e observados ao microscópio óptico. A partir daí, os tamanhos das cápsulas foram medidos conforme segue.

As lâminas foram fotografadas em aumento de 40X com auxílio do microscópio (Zeiss, Germany) e do software ISCapture Imaging. Usando o software ImageJ (National Institutes of Health), foram medidos o diâmetro total da levedura (DT), incluindo cápsula e corpo, e o diâmetro do corpo (DC), limitado pela parede celular, para 25 células por tratamento (Figura 3) (Firacative et al., 2014; Zaragoza, Casadevall, 2004). Uma lâmina padrão, com régua de 1mm, foi utilizada para configurar o software ImageJ previamente às medidas. O tamanho da cápsula foi considerado à partir do cálculo $(DT - DC) / 2$ (Hansakon et al., 2019). As medidas foram realizadas em cepas clínicas pré e pós inoculação em *Galleria mellonella* e seus resultados comparados estatisticamente.

Figura 3 – Desenho esquemático de medidas do diâmetro da cápsula de cepas de *Cryptococcus* spp.



Legenda: DT - diâmetro total da célula de *Cryptococcus* spp., DC - diâmetro do corpo de *Cryptococcus* spp.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.6 Análise estatística

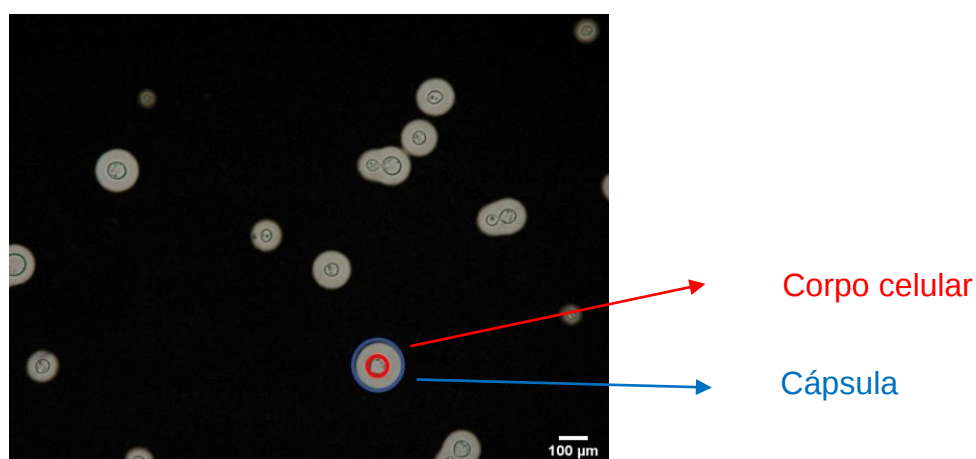
Os resultados dos ensaios foram submetidos à análise estatística utilizando o software GraphPad Prism version 8.4.1 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). O tipo de análise estatística foi determinado após a avaliação da normalidade dos dados. Para as amostras com distribuição normal, foram utilizados o Teste T e ANOVA. Já para os dados que não passaram pelo teste de normalidade, foram adotados o teste de Kruskal wallis suplementado pelo teste de Dunn. As curvas de sobrevivência em *Galleria mellonella* foram representadas graficamente, os tempos médios de sobrevida foram calculados e a estimativa das diferenças de sobrevida foi analisada pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox) (Firacative et al., 2014). Para validação das análises foi adotado o intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

4 RESULTADO

4.1 Identificação de *Cryptococcus* por métodos microbiológicos clássicos

Todas as cepas consideradas neste estudo apresentaram formação de pigmento castanho escuro (melanina) em ágar niger. A coloração por tinta da china permitiu a visualização de halo ao redor das células, indicando a presença de cápsula em todas as amostras avaliadas (Figura 4).

Figura 4 - Coloração de amostra clínica por tinta da china mostrando leveduras com presença de cápsulas



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Caracterização dos isolados por biologia molecular

4.2.1 Quantificação do DNA extraído

A quantidade de DNA obtida e a pureza das amostras foram satisfatórias para a amplificação por PCR *singleplex* (Palma et al., 2004,

Lehninger, 2018). O quadro 5 resume as concentrações de DNA obtidas e razão de pureza das extrações.

Quadro 5 – Quantificação de DNA extraído e razão de pureza

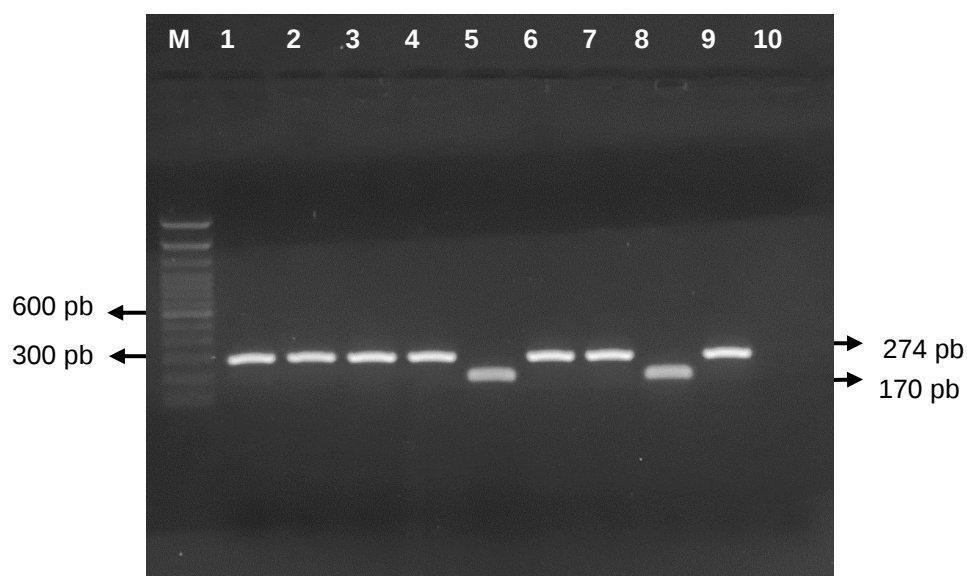
Cepa	Concentração (ng/μl)	Razão 260/280
ATCC 56990 (<i>C.gattii</i>)	80,60	1,97
ATCC 208821 (<i>C. neoformans</i>)	134,2	2,02
Clínica 1 (<i>C. neoformans</i>)	10,60	2,18
Clínica 2 (<i>C. neoformans</i>)	8,00	1,88
Clínica 3 (<i>C. neoformans</i>)	90,8	1,95
Clínica 4 (<i>C. neoformans</i>)	23,7	1,98
Clínica 5 (<i>C.gattii</i>)	272,7	1,95
Clínica 6 (<i>C. neoformans</i>)	47,8	1,98
Clínica 7 (<i>C. neoformans</i>)	54,6	1,56

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.2 Identificação molecular por PCR *singleplex*

A identificação molecular por PCR *singleplex*, utilizando os primers propostos por Feng et al. (2013), gerou amplificações com produtos de 274 pb coerentes com *C. neoformans* var. *grubii* e 170 pb com *C. gattii*. Dentre as amostras testadas, não foram evidenciadas amplificações de 224 pb, compatíveis com o padrão para *C. neoformans* var. *neoformans*, tão pouco amplificações simultâneas de dois fragmentos para os híbridos AD (274 e 224 pb), híbrido AB (274 pb e 170 pb) e híbrido BD (224 e 170 pb). Os tamanhos dos fragmentos de DNA amplificados e revelados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% são demonstrados na figura 5.

Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose para produtos de PCR *singleplex* de *Cryptococcus* spp.



Legenda: Gel de agarose à 1,5% em 0,5xTBE, corado por brometo de etídio e visualizado no transluminador. Isolados clínicos foram identificados como *C. neoformans* var. *grubii* e *C. gattii* e apresentaram os fragmentos esperados de 274 e 170 pb, respectivamente. M - marcador de peso molecular 100pb (Sigma-Aldrich); 1 – cepa clínica 1 *C. neoformans* var. *grubii*; 2 - cepa clínica 2 *C. neoformans* var. *grubii*; 3 - cepa clínica 3 *C. neoformans* var. *grubii*; 4 - cepa clínica 4 *C. neoformans* var. *grubii*; 5 - cepa clínica 5 *C. gattii*; 6 - cepa clínica 6 *C. neoformans* var. *grubii*; 7 - cepa clínica 7 *C. neoformans* var. *grubii*; 8 - *C. gattii* ATCC 56990; 9 - *C. neoformans* ATCC 208821 e 10 - controle negativo.
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3 Caracterização das amostras clínicas *in vitro*

4.3.1 Avaliação da atividade antifúngica e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As cepas do complexo de espécies *C. neoformans*/*C. gattii* consideradas nesse estudo foram sensíveis à AMB, com concentrações inibitórias mínimas (CIM) variando entre 0,015 e 0,031 ug/mL. As CIM para cada grupo considerado são demonstradas no quadro 6. As CIM para o fluconazol variaram entre 2 e 32 ug/mL para as cepas de *C. neoformans* e foi de 2 ug/mL para cepa de *C. gattii*.

Quadro 6 – Suscetibilidade antifúngica *in vitro* de *C. neoformans* var. *grubii* (n = 6) e *C. gattii* (n = 1) pelo método de micro diluição em caldo (EUCAST)

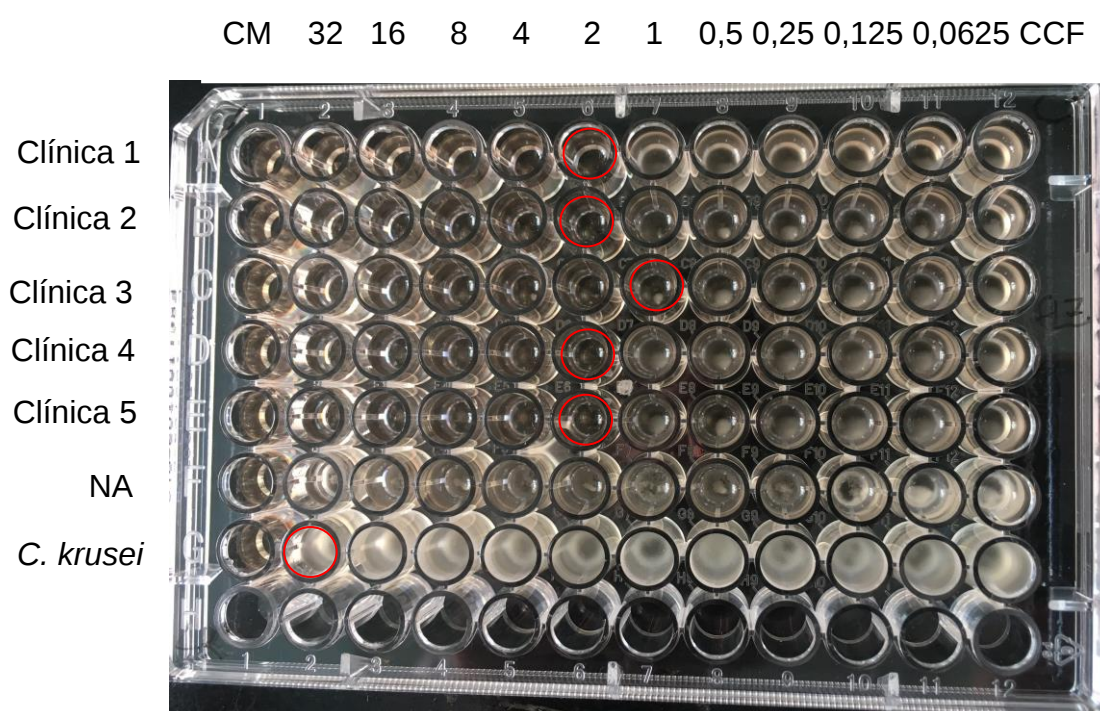
Antifúngico	Microdiluição em caldo CIM (ug/mL)		
	Cepas clínicas	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	<i>C. gattii</i>
Fluconazol	Faixa todas as cepas	2 - 32	Não aplicável
	cepa Clínica 1	2	
	cepa Clínica 2	2	
	cepa Clínica 3	1	
	cepa Clínica 4	2	
	cepa Clínica 5		2
	cepa Clínica 6	32	
	cepa Clínica 7	32	
Antifúngico	Microdiluição em caldo CIM (ug/mL)		
	Cepas clínicas	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	<i>C. gattii</i>
Anfotericina B	Faixa todas as cepas	0,015 -0,031	Não aplicável
	cepa Clínica 1	0,015	
	cepa Clínica 2	0,015	
	cepa Clínica 3	0,015	
	cepa Clínica 4	0,031	
	cepa Clínica 5		0,015
	cepa Clínica 6	0,015	
	cepa Clínica 7	0,015	

Legenda: Perfil de suscetibilidade de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp aos antifúngicos anfotericina B e fluconazol. CIM: concentração inibitória mínima, conforme determinado pelas diretrizes do EUCAST.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A levedura *C. krusei* é intrinsicamente resistente ao fluconazol e o valor de MIC está no intervalo de 16-64 $\mu\text{g/mL}$ (Arendrup et al., 2017) e em relação a AMB o intervalo de MIC varia entre 0,25 –1,0 $\mu\text{g/mL}$ (Committee et al., 2020). A figura 6 demonstra, dentre outras observações, o perfil de resistência de *C. krusei* ao fluconazol.

Figura 6 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) para cepas *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* frente ao fluconazol em placa de 96 poços



Legenda: Na horizontal, as concentrações testadas de fluconazol ($\mu\text{g/mL}$). Na vertical, as amostras testadas: Clínica 1 – 4 *C. neoformans* e Clínica 5 *C. gattii*. CM – Controle do meio; CCF – controle de crescimento fúngico; NA – amostra não participante desse estudo; *Candida krusei* – cepa controle da análise.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.2. Análise da formação do biofilme

4.3.2.1. Avaliação da biomassa do biofilme por cristal violeta

A capacidade dos isolados clínicos e cepas ATCC 208821 e ATCC 56990 para formar biofilme em superfície de poliestireno foi primeiramente analisada. A biomassa de biofilmes com 48 horas de formação, corados por cristal violeta, foi determinada com leitura de densidade ótica em 570 nm (DO 570 nm). As leituras mínimas, máximas, médias e desvio padrão de cada amostra são demonstradas no quadro 7. Todas as cepas inclusas no presente estudo foram capazes de formar biofilmes *in vitro*.

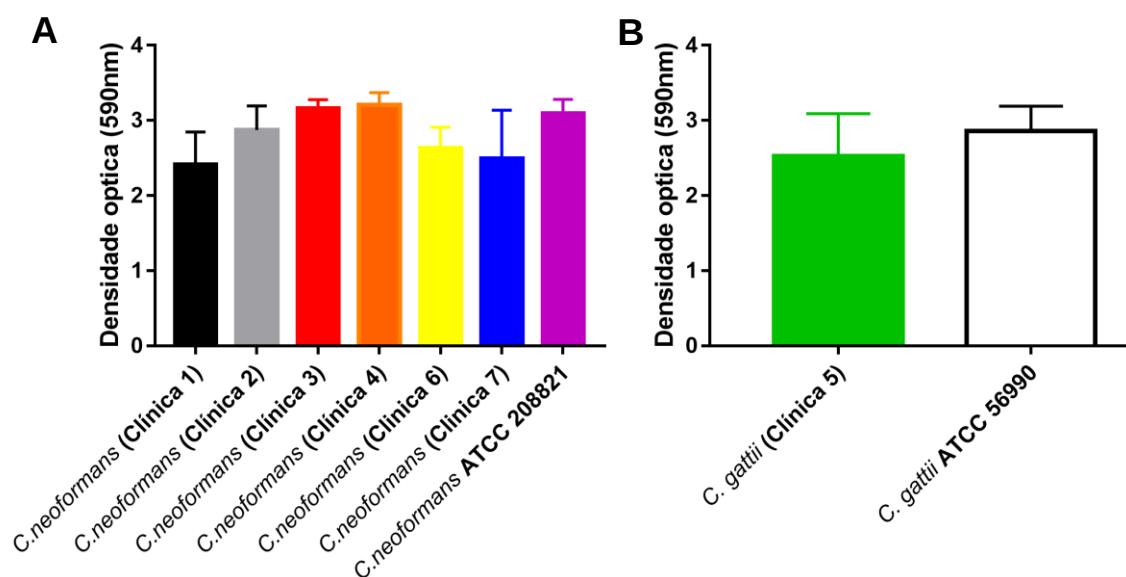
Quadro 7 – Leituras de DO 570 nm de biofilme corados por cristal violeta

Densidades ópticas 570nm Cristal Violeta									
	<i>Cryptococcus neoformans</i>							<i>Cryptococcus gattii</i>	
	Clínica 1	Clínica 2	Clínica 3	Clínica 4	Clínica 6	Clínica 7	ATCC 208821	Clínica 5	ATCC 56990
Mínima	3,33	3,56	3,47	3,73	3,71	3,55	3,74	3,75	2,63
Máxima	3,84	3,85	3,87	3,90	3,88	3,82	3,90	3,92	3,93
Média	3,71	3,79	3,73	3,82	3,80	3,75	3,82	3,83	3,67
Desvio padrão	0,16	0,09	0,13	0,05	0,05	0,09	0,05	0,07	0,42

Fonte: Elaborado pelo autor.

Não houve diferença estatística na quantificação de biomassa total entre as cepas clínicas de *C. neoformans* quando comparadas entre si e com a cepa padrão ATCC 208821 (Figura 7A). Da mesma forma, não foi notada diferença estatística entre a cepa clínica 5 (*C. gattii*), e a cepa padrão ATCC 56990 (Figura 7B).

Figura 7 – Avaliação da biomassa do biofilme de *Cryptococcus* spp. por cristal violeta



Legenda: Formação de biofilme por isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. e cepas de referência ATCC 20821 e ATCC 56990 em superfície de poliestireno. A biomassa do biofilme foi medida após coloração com cristal violeta (DO 570nm); os valores representam a média $\pm$ desvio padrão. A - Isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans*; B – Isolados clínicos de *Cryptococcus gattii*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.2.2. Avaliação da atividade metabólica do biofilme por XTT

Os biofilmes de todas as cepas consideradas nesse estudo demonstraram atividade metabólica. O quadro 8 mostra as leituras mínimas, máximas, médias e desvio padrão de cada cepa.

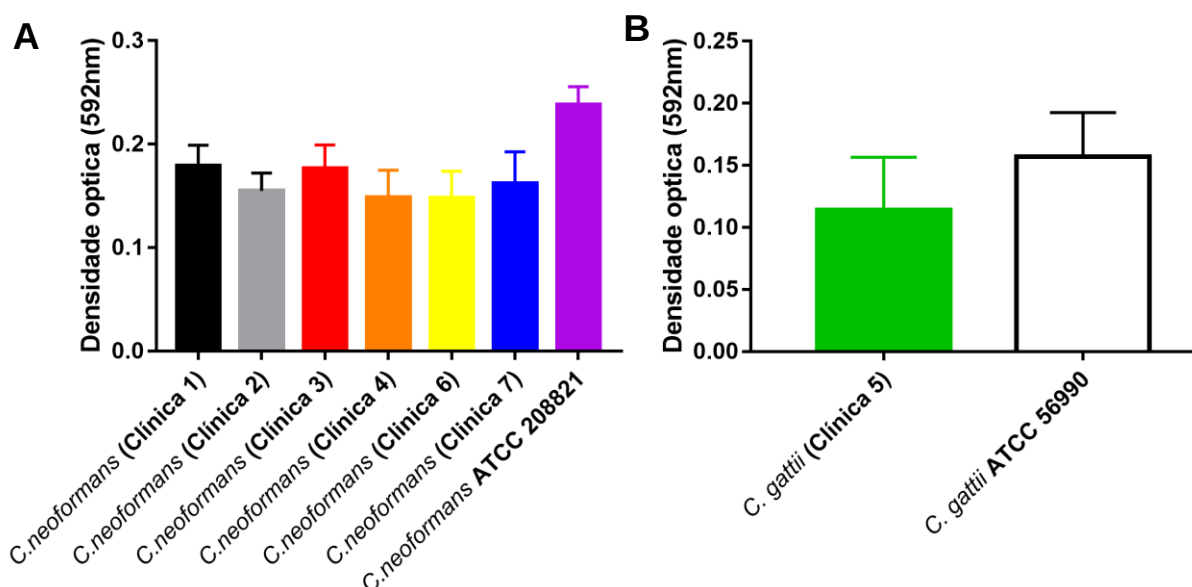
Para as amostras de *Cryptococcus neoformans*, foi possível verificar perfil semelhante entre todas as cepas desta espécie (Figura 8A). Além disso, a atividade metabólica entre cepa clínica *C. gattii* e a cepa padrão ATCC 56990 também foi semelhante (Figura 8B).

Quadro 8 – Leituras de DO 590 nm de biofilme corados por XTT

Densidades ópticas 590nm XTT									
	<i>Cryptococcus neoformans</i>							<i>Cryptococcus gattii</i>	
	Clínica 1	Clínica 2	Clínica 3	Clínica 4	Clínica 6	Clínica 7	ATCC 208821	Clínica 5	ATCC 56990
Mínima	0,145	0,129	0,149	0,107	0,107	0,132	0,213	0,064	0,122
Máxima	0,20	0,18	0,22	0,19	0,20	0,20	0,26	0,20	0,24
Média	0,179	0,155	0,177	0,149	0,148	0,162	0,238	0,114	0,157
Desvio padrão	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03	0,02	0,04	0,04

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 8 - Atividade metabólica de biofilme de *Cryptococcus* spp. avaliada pelo ensaio de XTT



Legenda: Formação de biofilme em superfície de poliestireno avaliada pela atividade metabólica das células através do ensaio de redução de XTT. A – Atividade metabólica de biofilme em amostras de *C. neoformans*. B - Atividade metabólica de biofilme em amostras de *C. gattii*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4 Caracterização dos isolados clínicos *in vivo* em modelo *Galleria mellonella*

4.4.1 Determinação da virulência por curva de sobrevivência

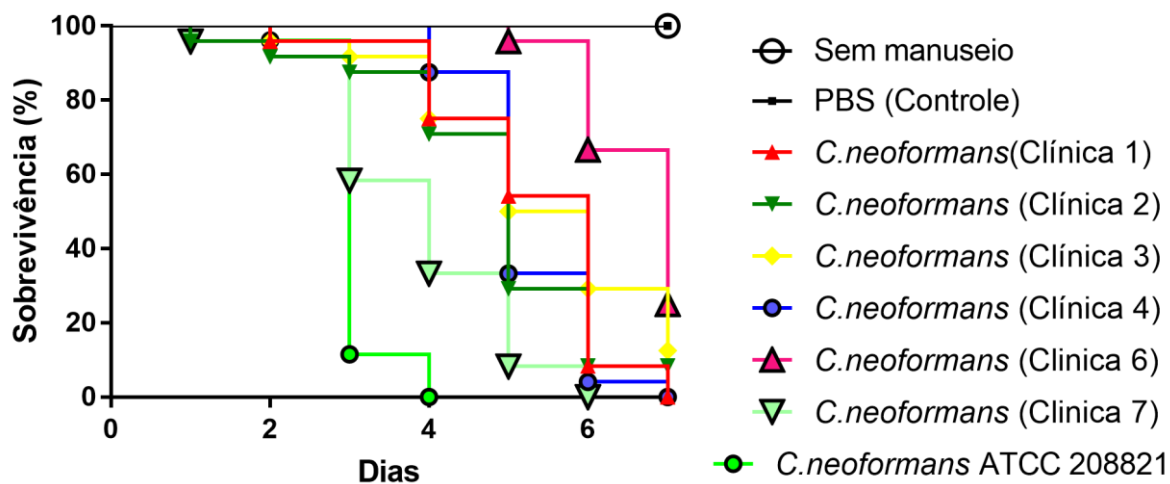
O aumento da mortalidade das larvas nos grupos clínicos foi observado de forma mais expressiva a partir do quarto dia de monitoramento (Figura 9). O tempo médio de morte das larvas infectadas com isolados clínicos de *C. neoformans* variou entre 6 e 7 dias. A morte total das larvas ocorreu no sexto dia após a inoculação para 33,33% dos grupos (2/6) e no sétimo dia para 16,66% dos grupos (1/6). Para as larvas infectadas com as cepas clínicas 2, 3 e 6 cerca de 8,33%, 12,5% e 24,0% das larvas permaneceram vivas no último dia do estudo, respectivamente. A morte total das larvas do grupo controle ATCC 208821 (H99) ocorreu após 4 dias de infecção (Figura 9A).

Em relação ao isolado clínico da espécie *C. gattii*, o tempo médio de morte das larvas infectadas foi de 6 dias. No sétimo dia após a inoculação, 20,8% das larvas permaneceram vivas quando infectadas com amostra clínica 5 e 33,33% com grupo ATCC 56990 (Figura 9B). A cepa de *C. gattii* mostrou-se menos virulenta do que a maioria das cepas de *C. neoformans* ($p < 0,05$), exceção feita às cepas 3 ($p = 0.1999$) e 6 ($p = 0.0946$).

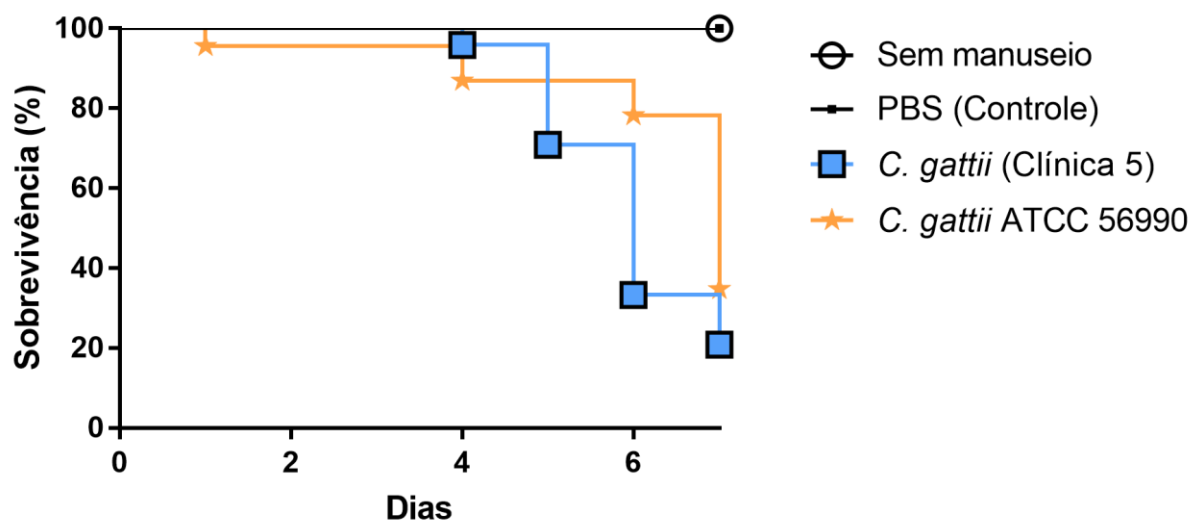
Os grupos controles de *Galleria mellonella* inoculados com PBS e sem manuseio mantiveram 100% das larvas vivas ao final do experimento.

Figura 9 – Ensaio de sobrevivência de *Galleria mellonella* infectada com cepas de *Cryptococcus* spp.

A)



B)



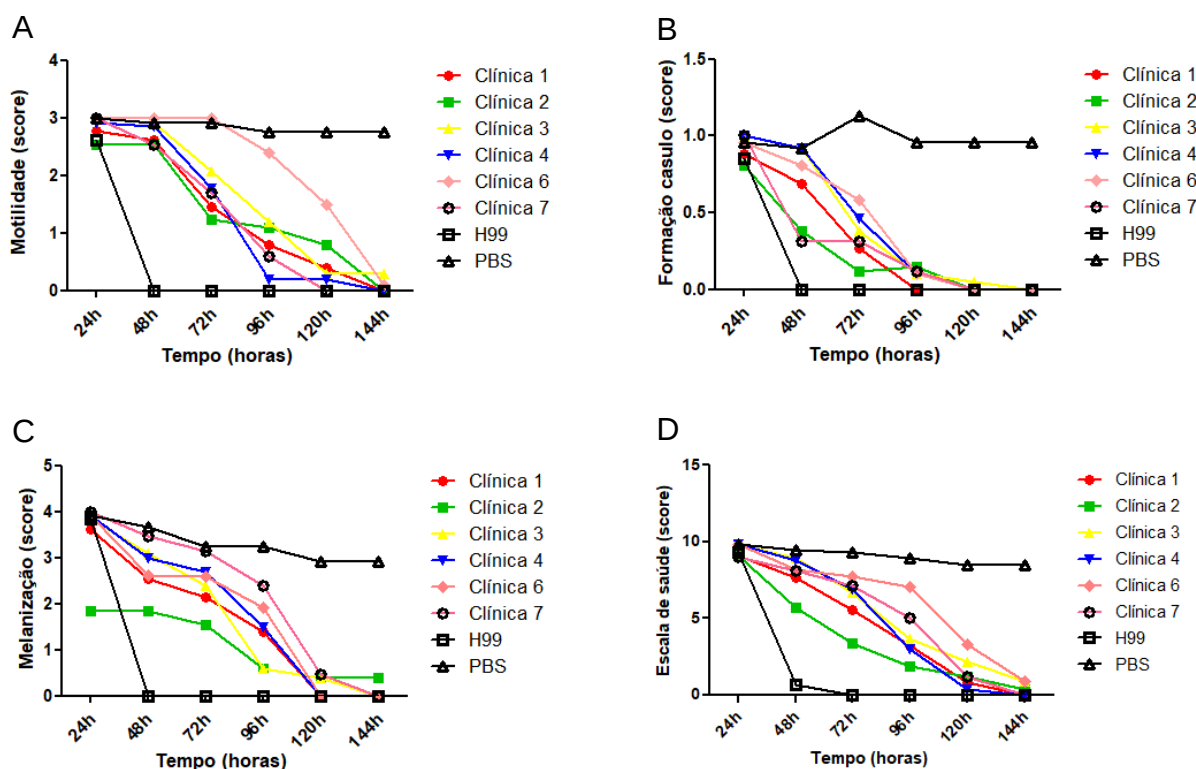
Legenda: A – Curva de sobrevivência de *G. mellonella* inoculadas com cepas de *C. neoformans*. B - Curva de sobrevivência *G. mellonella* inoculadas com cepas de *C. gattii*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4.2 Avaliação do índice de saúde em *Galleria mellonella*

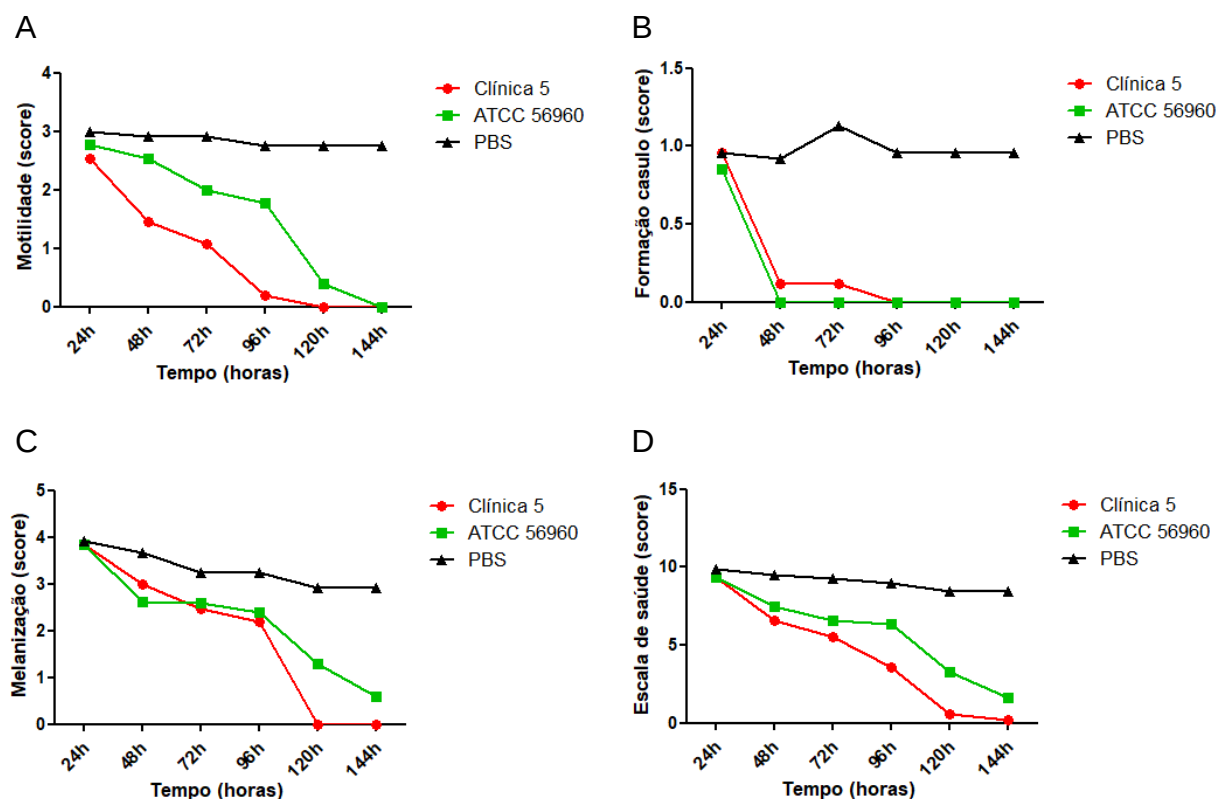
O índice de saúde de *Galleria mellonella* mostrou que todos os isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. foram capazes de reduzir diariamente a saúde das larvas quando comparados ao grupo não infectado PBS ($p < 0,05$). O grupo controle negativo exibiu maiores pontuações de motilidade, formação de casulo, melanização e sobrevivência (Figuras 10 e 11).

Figura 10 – Atributos do índice de saúde de *Galleria mellonella* infectada por *Cryptococcus neoformans*



Fonte: Elaborada pelo autor.

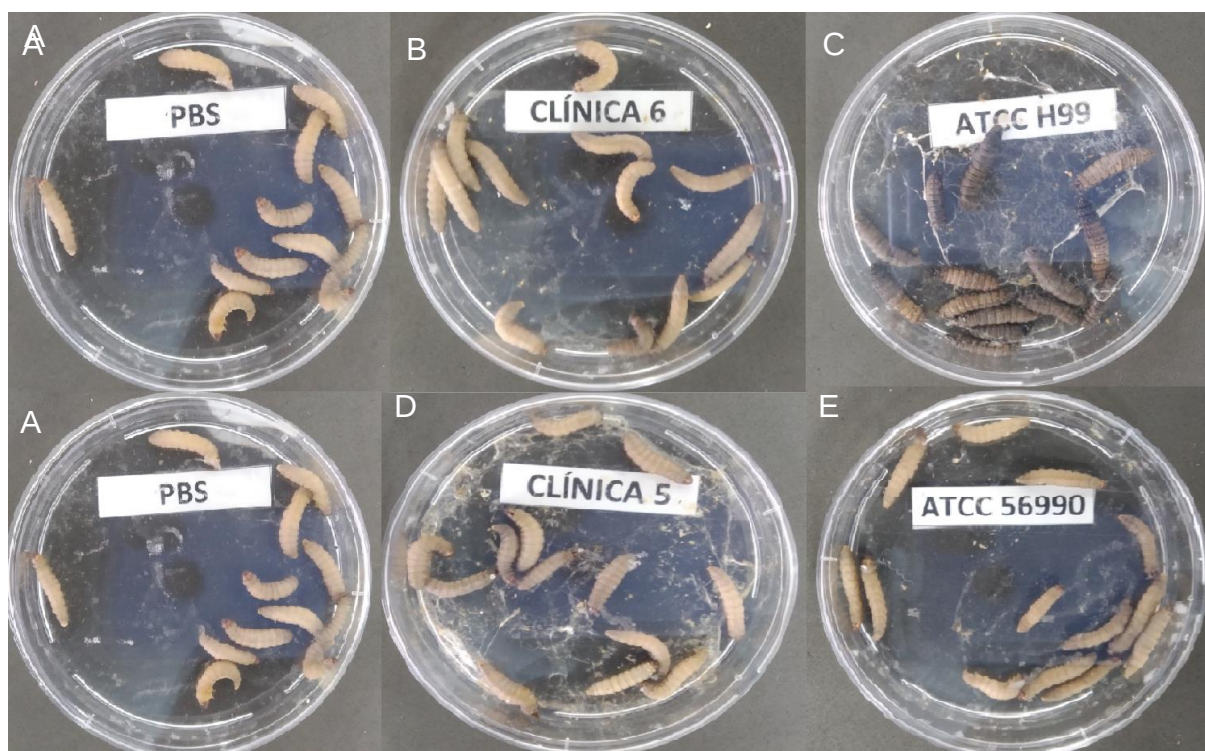
Figura 11 – Atributos do índice de *Galleria mellonella* infectada por *Cryptococcus gattii*



Fonte: Elaborada pelo autor.

Após 72 horas da inoculação, houve declínio expressivo no índice geral de saúde das larvas infectadas por *C. neoformans* (Figura 10D). Exceção a esse perfil foi observado para cepa clínica 6, que apresentou declive mais acentuado da curva entre o intervalo de 96 horas a 120 horas após a inoculação. Cinquenta por cento das larvas do isolado clínico 6 apresentaram algum grau de motilidade após 120 horas de inoculação, enquanto nas demais cepas de *C. neoformans* o máximo de larvas com graduação positiva de motilidade foi de 13% no mesmo período (Figura 10A). Além disso, 35% das larvas do grupo clínico 6 não apresentaram melanização após 96 horas de observação, em contraste com os demais grupos de *C. neoformans* cuja melanização ocorreu em 62,5% e 100,0% das larvas (Figura 10C). A melanização das larvas é demonstrada na figura 12. O grupo controle ATCC 208821 (H99) apresentou declínio da escala de saúde de 62,75% em 48 horas e de 100% após 72 horas de observação.

Figura 12 – Perfil de melanização de larvas de *G. mellonella* inoculadas por *Cryptococcus* spp.



Legenda: A – grupo controle negativo após 96 horas de inoculação; B – Cepa clínica de *C. neoformans* com menor melanização após 96 horas de inoculação; C – melanização de grupo controle ATCC 208821/H99 (*C. neoformans*) após 96 horas de inoculação; D – melanização de cepa clínica de *C. gattii* após 96 horas de inoculação; E - melanização de grupo controle ATCC 56990 (*C. gattii*) após 96 horas de inoculação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Considerando as larvas inoculadas por *C. gattii*, a pontuação do índice de saúde apresentou declínio expressivo entre 96 horas e 120 horas de observação (Figura 11D). Nesse mesmo intervalo, 6,67% das larvas apresentaram motilidade ao estímulo (Figura 11A), 70% apresentavam melanização (Figuras 11C e 12) e 100% ausência de formação de casulo (Figura 11B). A cepa clínica 5 apresentou 20,8% das larvas vivas no último dia do experimento.

4.4.3 Avaliação dos diâmetros do corpo e cápsula de *Cryptococcus* spp.

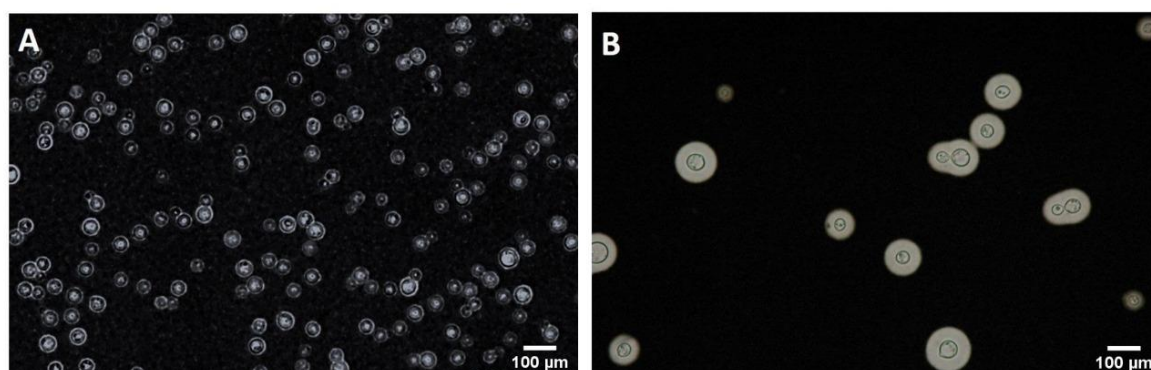
Houve diferença estatística entre os diâmetros do corpo e da cápsula de *Cryptococcus* spp. antes e após inoculação em *Galleria mellonella* para todas as amostras clínicas avaliadas ($p < 0,05$).

O diâmetro da cápsula de *Cryptococcus neoformans* cultivado em Sabouraud variou entre 3,5 e 12 μ m (Figura 13A). Após infecção em *G. mellonella*, foram observadas cápsulas com diâmetros variando entre 8 e 43 μ m (Figura 13B). Cápsulas com diâmetro $\geq 20\mu$ m estiveram presente em 42,57% das medidas em *C. neoformans*. A amostra clínica 6 apresentou 48% dos diâmetros de cápsula $\geq 30\mu$ m pós infecção. Já as amostras clínicas 3 e 4 tiveram medidas $\geq 30\mu$ m em 28% e 8% das vezes, respectivamente. O diâmetro do corpo de *Cryptococcus neoformans* cultivado em Sabouraud variou entre 9 e 26 μ m (Figura 13A). Após infecção em *G. mellonella*, o diâmetro dos corpos variou entre 15 e 51 μ m (Figura 13B).

O diâmetro da cápsula de *Cryptococcus gattii* cultivado em Sabouraud variou entre 3,5 e 12 μ m. Após infecção em *G. mellonella*, foram observadas cápsulas com diâmetros variando entre 8 e 43 μ m. O diâmetro do corpo de *Cryptococcus gattii* cultivado em Sabouraud variou entre 9 e 28 μ m. Após infecção em *G. mellonella*, o diâmetro do corpo variou entre 22 e 44 μ m.

Para a cepa clínica de *Cryptococcus gattii*, o diâmetro médio da cápsula foi 5,78 μ m quando cultivada em Sabouraud e 28,12 μ m após inoculação em *G. mellonella*. Os diâmetros da cápsula foram $\geq 30\mu$ m em 40% das medidas. O aumento da cápsula da cepa clínicas de *Cryptococcus gattii* após infecção foi estatisticamente maior quando comparado ao da cepa controle ATCC 56990 ($p < 0,05$).

Figura 13 – Aumento capsular de isolado clínico de *Cryptococcus neoformans* após infecção de *Galleria mellonella*

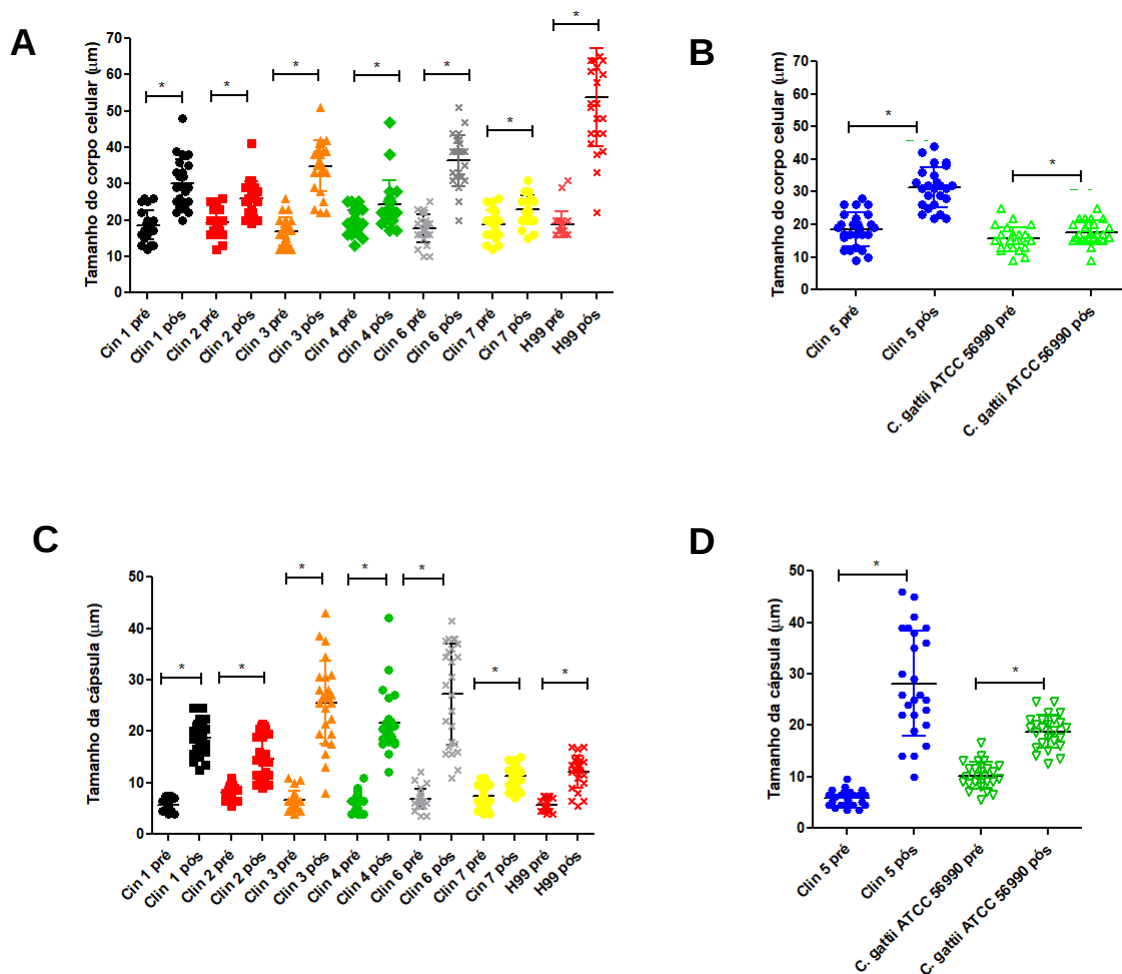


Legenda: A – cepa clínica 1 (*C. neoformans*) cultivada em ágar Sabouraud; B – cepa clínica 1 (*C. neoformans*) após inoculação em *G. mellonella*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os diâmetros do corpo e da cápsula de cepas de *Cryptococcus* spp. cultivados em Sabouraud e após infecção de *G. mellonella* são demonstrados na figura 14.

Figura 14 – Medidas dos tamanhos do corpo e cápsula de cepas de *Cryptococcus* spp.



Legenda: A) Análise do tamanho do corpo de *C. neoformans* cultivado em ágar Sabouraud e após inoculação em *G. mellonella*. B) Análise do tamanho do corpo de *C. gattii* cultivado em ágar Sabouraud e após inoculação em *G. mellonella*. C) Análise do tamanho das cápsulas de *C. neoformans* cultivado em ágar Sabouraud e após inoculação em *G. mellonella*. D) Análise do tamanho das cápsulas de *C. gattii* cultivado em ágar Sabouraud e após inoculação em *G. mellonella*. * indicam as diferenças estatisticamente significante (teste de Kruskal-Wallis e como pós teste, Mann-Whitney, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

5 DISCUSSÃO

A infecção por *Cryptococcus* spp. é uma doença com alta morbidade e mortalidade (Rajasingham et al., 2017). No Brasil, a criptococose foi identificada como uma das infecções fúngicas mais letais entre pacientes com HIV (Nunes et al., 2018), porém, estimativas precisas de incidência nesse país não estão disponíveis.

Em particular, uma incidência média anual de 0,45 casos de criptococose meníngea por 100 mil habitantes foi relatada na população geral do estado do Rio de Janeiro - RJ (Leimann, Koifman, 2008). Porém, na maioria dos estados brasileiros não há estimativa de prevalência e a observação de correlação entre isolados ambientais e clínicos também é limitada, o que diminui o poder de associação estatística (Andrade-Silva et al., 2018; Spina-Tensini et al., 2017; Trilles et al., 2008).

Que seja de nosso conhecimento, estudos fenotípicos e genotípicos de *Cryptococcus* spp. não foram conduzidos em amostras clínicas na cidade de São José dos Campos – SP até esse momento, tão pouco em outras cidades da região do Vale do Paraíba. A visão das correlações entre nichos ecológicos, variabilidade genética, susceptibilidade aos antifúngicos, fatores de virulência e desfecho clínico é ferramenta de suma importância para estabelecimento de políticas públicas de saúde que contribuam para controle da doença na região.

Quando pensamos na alta mortalidade das infecções criptocócicas (Rajasingham et al., 2017), metodologias diagnósticas rápidas e precisas tornam-se importantes aliadas para condutas clínicas eficazes. A técnica de PCR *singleplex* avaliada no presente trabalho se mostrou uma ferramenta diagnóstica atraente, uma vez que foi capaz de diferenciar rapidamente as espécies *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* e *Cryptococcus gattii* em amostras biológicas de pacientes tratados em hospitais públicos na cidade de São José dos Campos. Dentre as cepas estudadas, não foram evidenciadas ampliações compatíveis com o padrão de *C. neoformans* var. *neoformans*, apesar da abrangência dos iniciadores moleculares utilizados incluírem a diferenciação dessa espécie.

A tipificação molecular baseada na perda de íntron e na personalização de seu tamanho foi utilizada nesse trabalho para diferenciação do complexo de espécies *C. neoformans*/*C. gattii*. Os iniciadores moleculares desenhados para a reação de PCR *singleplex* flanquearam dois íntrons adjacentes dentro do suposto gene transportador de açúcar (*STR1*) e geraram diferentes tamanhos de amplicons, os quais foram assemelhados aos tamanhos observados por Feng et al. (2013) para as diferentes espécies e variedades.

A prevalência de espécies de *Cryptococcus* spp. na cidade de São José dos Campos reproduziu as características encontradas na maioria das regiões do Brasil. Considerando os estudos brasileiros referenciados no quadro 2, 86,13% das amostras clínicas foram identificadas como espécie *C. neoformans* var. *grubbii* (VNI, VNII e VNB) e 13,71% como *C. gattii* (VGI, VGII e VGIII). Embora não tenhamos trabalhado com a diferenciação genotípica das cepas nesse momento, 85,72% de nossas amostras apresentaram perfil molecular de espécie semelhante a *C. neoformans* var. *grubbii* e 14,28% semelhante a *C. gattii* pela amplificação do gene *STR1*.

Atualmente, vivemos uma era de grande resistência microbiana aos antibióticos e antifúngicos e, com isso, uma busca incessante por novos tratamentos tem sido empreendida para novas doenças e para aquelas que nos acompanham ao longo dos séculos. Com a criptococose não é diferente. Sabe-se que o tratamento convencional para essa doença gravíssima tem sido cada vez menos eficaz, mas a literatura científica tem demonstrado o empenho de grupos em pesquisar alternativas terapêuticas para seu tratamento (Henao-Martínez et al., 2018; Rolfes et al., 2014).

As propostas terapêuticas atuais para tratamento da criptococose são limitadas. A terapia padrão recomendada pela Organização Mundial da Saúde consiste em AMB combinada a 5-fluorocitosina, seguida por triazóis, como fluconazol, para consolidação da terapia (WHO, 2018).

Os azólicos bloqueiam a via de síntese do ergosterol através da inibição da enzima 14-lanosterol desmetilase, que é codificada pelo gene *ERG11* em *C. neoformans* (Revankar et al., 2004). Resistência *in vitro* aos antifúngicos triazólicos têm sido descritas para *Cryptococcus* spp., mais para fluconazol do que para os mais novos triazóis voriconazol e posaconazol (Espinell-Ingroff et al., 2012) e seus mecanismos já foram identificados em *C. neoformans* (Lamb

et al., 1995; Venkateswarlu et al., 1997). Também há relato em literatura de cepas resistentes a anfotericina B que foram associadas à falha do tratamento (Lozano-Chiu et al., 1998; Pharkjaksu et al., 2020).

Valores de corte epidemiológicos (ECOFF) têm sido propostos para identificar cepas resistentes de *Cryptococcus* spp. em função da indisponibilidade de pontos de corte clínicos (PCC) para alguns antifúngicos, (Espinel-Ingroff et al., 2012; Espinel-Ingroff, Turnidge, 2016; Pharkjaksu et al., 2020).

Pontos de corte clínicos são usados para indicar micro-organismos que são capazes de responder (suscetíveis) ou não (resistentes) ao tratamento com um determinado agente antimicrobiano administrado no regime de dosagem aprovado para um determinado período. Eles são estabelecidos usando uma combinação de dados clínicos *in vitro* e *in vivo*, incluindo a distribuição das CIM, farmacocinética e farmacodinâmica em modelo animal e resultados clínicos (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/). Já o ECOFF é a CIM que separa uma população de isolados com resistência adquirida ou mutacional (tipo não selvagem) de outra população sem resistência (tipo selvagem) com base em seu valor de CIM fenotípico (Espinel-Ingroff, Turnidge, 2016).

Uma linha tênue é traçada, com divergência entre os dados, quando se avaliam estudos que buscaram correlacionar suscetibilidades antifúngicas aos diferentes genótipos de *Cryptococcus* spp. Alguns estudos, por exemplo, relatam que *C. neoformans* VNI é menos suscetível a anfotericina B, fluconazol, itraconazol e flucitosina quando comparado a *C. deneoformans* VNIV e o híbrido interespecie VNIV (Barião et al., 2020; Chowdhary et al., 2011; Guinea et al., 2010; Hagen et al., 2012). Em contrapartida, outros pesquisadores não relatam diferenças de suscetibilidade relacionadas ao genótipo (Favalessa et al., 2014; Herkert et al., 2018). O ECOFF foi proposto para *C. neoformans* VNI como sendo $\leq 8 \mu\text{g/mL}$. Para outras cepas de *Cryptococcus*, o ECOFF foi considerado como $\leq 16 \mu\text{g/mL}$ (Espinel-Ingroff et al., 2012).

O presente trabalho avaliou as CIM de cepas clínicas de *Cryptococcus* spp. para os antifúngicos AMB e fluconazol. Todas as cepas clínicas foram sensíveis a AMB e apresentaram baixas CIM ($\leq 0,031 \mu\text{g/mL}$), o que

corroborara com outros relatos de sensibilidade *in vitro* de *C. neoformans*/*C. gattii* (Arendrup et al., 2017; Favalessa et al., 2014; Grizante Barião et al., 2020; Martinez, Casadevall, 2006; Spadari et al., 2020). Referente ao fluconazol, as CIM foram $\leq 2 \mu\text{g/mL}$, exceto para duas cepas de *C. neoformans* (28,57%) que apresentaram CIM de $32 \mu\text{g/mL}$ e instigam estudos complementares posteriores.

O arsenal de características vantajosas para os micro-organismos mostra que a produção de biofilme é um mecanismo de virulência notório pois estas estruturas são resistentes aos antibióticos e, portanto, difíceis de tratar (Martinez, Casadevall, 2006; Tavares et al., 2019).

No presente estudo foi possível verificar a formação de biomassa nos biofilmes em todos os grupos avaliados, entretanto, não houve diferenças estatísticas entre as cepas clínicas de mesma espécie ou entre espécies. Em relação à atividade metabólica, dados semelhantes foram observados. Entretanto foi possível verificar que a cepa clínicas de *C. gattii* apresentou menores valores de densidade optica quando comparadas com as cepas de *C. neoformans*.

Benaducci et al. (2016) não evidenciaram diferenças entre a cinética de formação do biofilme nas espécies de *C. neoformans* e *C. gattii*, apesar das leituras de densidades óticas serem menores para a espécie de *C. gattii*.

O pequeno número de cepas de *C. gattii* presente em nosso estudo ($n = 1$) é um fator que dificulta a robustez de análises estatísticas e abre a visão para estudos posteriores maiores em número de amostras.

Apesar de não estudarmos nesse trabalho os componentes capsulares em diferentes genótipos, é conhecido que a composição da cápsula pode variar entre os sorotipos de *Cryptococcus* spp (McFadden et al., 2007) e que a concentração de GXM têm importante papel para a formação dos biofilmes (Camacho, Casadevall, 2018). A cápsula do sorotipo B, por exemplo, apresenta mais grupos xilosil quando comparada ao sorotipo D, o que pode afetar a capacidade de adesão em superfícies plásticas. Martinez, Casadevall (2005) mostraram que o GXM de espécies de *Cryptococcus* do sorotipo D aderiram mais fortemente ao poliestireno em comparação com os tipos capsulares dos sorotipos A e B. Assim, a capacidade relativa do GXM de se ligar a poliestireno

está correlacionada com a capacidade de formação de biofilme por diferentes cepas nesse suporte.

Consideramos em nosso estudo o aumento do tamanho da cápsula após inoculação no modelo invertebrado de *G. mellonella*, porém não houve correlação estatística entre o aumento da cápsula e a quantificação do biofilme total em placa de poliestireno. Igualmente, Spadari et al. (2020) não observaram essa correlação em estudo semelhante, o que pode sugerir que outros fatores estejam contribuindo para o aumento capsular em *G. mellonella* (Hommel et al., 2017).

Cryptococcus spp. é capaz de produzir células com diferenças no tamanho do corpo celular, particularmente durante a infecção pulmonar inicial (Feldmesser et al., 2001), e pode modular o tamanho e a estrutura de sua cápsula durante a infecção *in vivo* e *in vitro* (Hommel et al., 2017; Trevijano-Contador, Zaragoza, 2018; García-Rodas et al., 2011; Zaragoza et al., 2010). Uma vez dentro do hospedeiro, *Cryptococcus* spp. passa por uma variedade de processos adaptativos, incluindo secreção de fatores de virulência e expansão da cápsula polissacarídica.

No presente trabalho foram avaliados os tamanhos da cápsula e corpo celular de *Cryptococcus* pré e pós infecção em modelo invertebrado de *G. mellonella*. Aumentos significativos de cápsulas e células foram observados em todas as cepas clínicas após a passagem pelas larvas, o que também foi observado em outros estudos semelhantes (Firacative et al., 2020; Velez et al., 2018).

García-Rodas et al. (2011), ao investigarem a interação entre *C. neoformans* e *G. mellonella*, perceberam que a infecção criptocócica neste hospedeiro também está associada a alterações morfológicas significativas, como o aumento significativo no tamanho do corpo celular e da cápsula e o aparecimento de células titan. Além disso, também constataram aumento da densidade da cápsula durante a infecção. Em função desse tipo de resposta também estar presente em modelos vertebrados, as larvas de *G. melonella* mostram-se modelos interessantes para o estudo de interações com o hospedeiro e de patogenicidade do *Cryptococcus* spp.

No presente estudo, o maior percentual de diâmetros de cápsulas acima de 30µm após infecção foi observado na cepa clínica 6. Essa

observação é coerente com o fato de que o aumento e a densidade da cápsula parecem estar relacionados ao tempo de infecção (García-Rodas et al., 2011; Maxson et al., 2007), uma vez que larvas infectadas com a clínica 6 apresentaram a maior sobrevida e índice de saúde entre as amostras de *C. neoformans* quando estudadas em modelo *in vivo*.

Galleria mellonella foi escolhida como modelo invertebrado no presente estudo em função do benefício de sobrevivência das larvas em várias condições de temperatura (entre 25 e 37 °C) (Mylonakis et al., 2005). A capacidade de estudar patógenos a 37 °C permite a correlação entre características de virulência e temperatura. Outros fatores que também influenciaram a escolha foram a facilidade de inoculação e a possibilidade de infecção com uma quantidade precisa de células fúngicas.

Nesse estudo, *C. neoformans* foi capaz de causar infecção letal no modelo de *G. mellonella* em 37 °C. A morte de 100% das larvas ocorreu entre 6 e 7 dias. Esse resultado concorda com o observado em estudo com inóculo semelhante (5×10^8 células/mL) (Spadari et al., 2020). Grizante Barião et al. (2020) encontraram morte total das larvas entre 5 e 7 dias com inóculos de *C. neoformans* padronizados em 10^6 células/mL. Fuchs et al. (2010) demonstraram morte total das larvas em 4 dias após utilização de inóculos de 10^6 células/mL. É sabido que morte de *G. mellonella* infectada por *C. neoformans* depende da concentração do inóculo e da temperatura de incubação (García-Rodas et al., 2011). Mylonakis et al. (2005), observaram que a sobrevida média de larvas inoculadas com 2×10^4 células/mL e incubadas a 37 °C foi de 5 dias e que inóculos menos concentrados permitiram sobrevidas médias maiores das larvas (Mylonakis, et al., 2005).

Em nosso estudo, a sobrevida média do grupo controle H99 foi de 3 dias. Esta cepa apresentou perfil semelhante (sobrevida média entre 3 a 4 dias) em estudos conduzidos por Grizante Barião et al. (2020) e Spadari et al. (2020). Em outro estudo, a cepa ATCC 208821 de *C. neoformans* (H99) foi capaz de matar *G. mellonella* com inóculos de 20 leveduras por larva (Fuchs et al., 2010).

Os resultados do presente trabalho mostraram que as primeiras mortes para cepa clínica 5 (*C. gattii*) ocorreram 96 horas após inoculação e 20,8% das larvas sobreviveram até o final do experimento. A utilização de *G. mellonella*

para estudos de virulência de *C. gattii* já foi relatada anteriormente, adotando inóculos com grandeza de 10^8 células/mL (Firacative et al., 2020). Firacative et al. (2020) não observaram diferença estatística entre as curvas de sobrevivência de cepas de *C. gattii* de alta (CDCR265) e de baixa (DMST20767) virulência, apesar da diferença nos tempos de início de mortes entre elas (96 e 72 horas, respectivamente).

As condições de criação e armazenamento de *G. mellonella*, como dieta, umidade, temperatura e requisitos antibacterianos podem resultar em diminuição ou alteração de sua imunidade (Cook, McArthur, 2013; Firacative et al., 2020; Junqueira, 2012). A alteração da imunidade pode afetar a resposta das larvas à infecção, diminuindo assim a reprodutibilidade dos experimentos de virulência fúngica. A comparação de resultados experimentais entre laboratórios não pode excluir os padrões de criação e seleção de *G. mellonella* por eles adotados, os quais devem produzir larvas não estressadas e com o mínimo de variabilidade genética.

Grande parte dos estudos usando *G. mellonella* como um modelo de infecção classifica a morte larval como o ponto final. Uma modificação desta abordagem, no entanto, é avaliar o índice de saúde, considerando atributos como melanização, formação de casulo, motilidade, e expressá-lo como um valor logarítmico (Loh et al., 2013). A estimativa numérica do índice de saúde pode auxiliar na comparação de dados entre laboratórios, minimizando interferentes que podem impactar na vitalidade das larvas como tipo de alimentação e forma de cultivo.

Em nosso estudo, a determinação visual de melanização foi um ponto limitante para maior precisão da estimativa do índice de saúde, uma vez que as larvas já apresentavam algum grau de formação de pigmentos previamente à inoculação com *Cryptococcus* spp. Outros estudos que estimaram o índice de saúde partiram da escolha de larvas sem manchas para inoculação (Fuchs et al., 2010).

Para criadouros de *G. mellonella* impossibilitados de observar condições antimicrobianas de cultivo, a quantificação da melanização e comparação com grupo controle negativo pode ser uma alternativa que forneça maior precisão ao índice de saúde uma vez que parte da resposta imune inata em insetos depende do aprisionamento de patógenos na melanina (Cerenius et

al., 2008).

Embora se saiba que a produção da cápsula está relacionada à formação do biofilme e que esses fatores de virulência são importantes para a patogênese da criptococose, não foi observada correlação entre a formação da cápsula / biofilme e a virulência em *G. mellonella*. Vale ressaltar que outros fatores de virulência expressos por isolados clínicos podem ter influenciado os resultados encontrados nos ensaios de virulência, e que o sinergismo entre eles também deve ser levado em consideração (Spadari et al., 2020; Martinez, Casadevall, 2007; Liu et al., 2008).

Os resultados deste estudo destacam a importância de se caracterizar sistematicamente a tipagem molecular, suscetibilidade antifúngica e virulência do complexo de espécies *C. neoformans*/*C. gattii* isolados de casos de criptococose de uma região, pois a avaliação da disseminação de espécies e tipos moleculares, bem como o padrão de suscetibilidade antifúngica e virulência correspondentes, auxiliarão o manejo mais preciso da infecção criptocócica.

6 CONCLUSÃO

- a) Nesse estudo, a partir da amplificação do gene *STR1* por PCR, foi possível identificar seis cepas clínicas como *C. neoformans* var. *grubii* e uma como *C. gattii*;
- b) Independentemente da espécie, todas as cepas foram sensíveis a AMB e a CIM para o fluconazol foi ≤ 2 ug/mL, exceto para duas cepas de *C. neoformans* que apresentaram CIM de 32 ug/mL;
- c) Todas as cepas clínicas de *Cryptococcus* foram capazes de formar biofilmes em placa de poliestireno e a quantificação da biomassa e atividade mitocondrial foi semelhante entre todas as cepas das duas espécies;
- d) Houve aumento significativo dos diâmetros da cápsula de *Cryptococcus* spp. antes e após inoculação em *Galleria mellonella* para todas as cepas clínicas, sendo estatisticamente maior na espécie *C. gattii*. O aumento da cápsula não foi correlacionado com a formação de biofilme;
- e) As cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* foram capazes de causar infecção em *G. mellonella*. Além disso, o índice de saúde das larvas de *G. mellonella* inoculadas com cepas de *C. neoformans* mostrou diferenças sutis de pontuação entre os grupos com mesma sobrevivência.

REFERÊNCIAS*

- Alspaugh JA. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Fungal Genet Biol.* 2015;78(919):55–8. doi: 10.1016/j.fgb.2014.09.004. PMID: 25256589.
- Andrade-Silva L, Ferreira-Paim K, Ferreira TB, Vilas-Boas A, Mora DJ, Manzato VM et al. Genotypic analysis of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates from Brazil reveals the presence of VNB isolates and a correlation with biological factors. *PLoS One.* 2018;13(3):1–21. doi: 10.1371/journal.pone.0193237. PMID: 29505557.
- Arendrup, M.C., Cuenca-Estrella, M., Lass-Flörl, C., Hope, W. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). *Clinical Microbiology and Infection.* 2018; 246-247. doi: org/10.1111/j.1469-0691.2012.03880.x.
- Arvanitis M, Glavis-Bloom J, Mylonakis E. Invertebrate models of fungal infection. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2013;1832(9):1378–83. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.03.008. PMID: 23517918.
- Barcellos VA, Martins LMS, Fontes ACL, Reuwsaat JCV, Squizani ED, de Sousa Araújo GR. Genotypic and phenotypic diversity of *cryptococcus gattii* vgii clinical isolates and its impact on virulence. *Front Microbiol.* 2018 Feb 6;9:132. doi: 10.3389/fmicb.2018.00132. PMID: 29467743; PMCID: PMC5808156.
- Barião PHG, Tonani L, Cocio TA, Martinez R, Nascimento É, Kress MR von Z. Molecular typing, in vitro susceptibility and virulence of *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex clinical isolates from south-eastern Brazil. *Mycoses.* 2020;63(12):1341–51. doi: 10.1111/myc.13174. PMID: 32869413.
- Benaducci T, Sardi Jde C, Lourencetti NM, Scorzoni L, Gullo FP, Rossi SA, et al. Virulence of *cryptococcus* sp. biofilms in vitro and in vivo using *Galleria mellonella* as an alternative model. *Front Microbiol.* 2016 Mar 9;7:290. doi: 10.3389/fmicb.2016.00290. PMID: 27014214; PMCID: PMC4783715.
- Bielska E, May RC. What makes *Cryptococcus gattii* a pathogen? *FEMS Yeast Res.* 2016;16(1):1–12. doi: 10.1093/femsyr/fov106.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2020 Jan 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Diaz MR, Spanjaard L, Dromer F, et al. Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *FEMS Yeast Res.* 2006;6(4):599–607. doi: 10.1111/j.1567-1364.2006.00082.x.

Braun DK, Janssen DA, Marcus JR, Kauffman CA. Cryptococcal infection of a prosthetic dialysis fistula. *Am J Kidney Dis.* 1994;24(5):864–7. doi: 10.1016/S0272-6386(12)80683-4. PMID: 7977331.

Camacho E, Casadevall A. Cryptococcal traits mediating adherence to biotic and abiotic surfaces. *J Fungi (Basel).* 2018 Jul 29;4(3):88. doi: 10.3390/jof4030088. PMID: 30060601; PMCID: PMC6162697.

Casadevall A, Rosas AL, Nosanchuk JD. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr Opin Microbiol.* 2000;3(4):354–8. doi: 10.1016/S1369-5274(00)00103-X. PMID: 10972493.

Cerenius L, Lee BL, Söderhäll K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol.* 2008;29(6):263–71. doi: 10.1016/j.it.2008.02.009. PMID: 18457993.

Chapman N, Doubell A, Barnsley P, Lisette O, Chowdhary V, Rugarabamu G, et al. Neglected disease research and development: uneven progress. *Policy Cures Res.* 2019:24-88.

Cheng PY, Sham A, Kronstad JW. *Cryptococcus gattii* isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 2009;77(10):4284–94. doi: 10.1128/IAI.00628-09. PMID: 19635827.

Cherniak R, Sundstrom JB. Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 1994;62(5):1507–12. doi: 10.1128/IAI.62.5.1507-1512.1994. PMID: 8168912.

Chowdhary A, Randhawa HS, Sundar G, Kathuria S, Prakash A, Khan Z, et al. In vitro antifungal susceptibility profiles and genotypes of 308 clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* serotype B from north-western India. *J Med Microbiol.* 2011;60(7):961–7. doi: 10.1099/jmm.0.029025-0. PMID: 21393452.

Christianson JC, Engber W, Andes D. Primary cutaneous cryptococcosis in immunocompetent and immunocompromised hosts. *Med Mycol.* 2003;41(3):177–88. doi: 10.1080/1369378031000137224. PMID: 12964709.

Cogliati M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* : An Atlas of the Molecular Types. *Scientifica (Cairo).* 2013;2013:1–23. doi: 10.1155/2013/675213. PMID: 24278784.

Cogliati M. Global Molecular epidemiology of *cryptococcus neoformans* and *cryptococcus gattii*: an atlas of the molecular types. *Scientifica (Cairo).*

2013;2013:675213. doi: 10.1155/2013/675213. Epub 2013 Jan 9. PMID: 24278784; PMCID: PMC3820360.

Cordero RJB, Casadevall A. Functions of fungal melanin beyond virulence. *Fungal Biol Rev.* 2017;31(2):99–112. doi: 10.1016/j.fbr.2016.12.003. PMID: 31649746.

De Leon-Rodriguez CM, Fu MS, Çorbali MO, Cordero RJB, Casadevall A. The capsule of *Cryptococcus neoformans* modulates phagosomal pH through its acid-base properties. *MSphere.* 2018;3(5):1–8. doi: 10.1128/msphere.00437-18.

Del Poeta M. Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell.* 2004;3(5):1067–75. doi: 10.1128/EC.3.5.1067-1075.2004. PMID: 15470235.

Desalermos A, Fuchs BB, Mylonakis E. Selecting an invertebrate model host for the study of fungal pathogenesis. *PLoS Pathog.* 2012;8(2):8–11. doi: 10.1371/journal.ppat.1002451.

Donlan RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(5):881–90. doi: 10.3201/eid0809.020063. PMID: 12194761.

Eisenman HC, Duong R, Chan H, Tsue R, McClelland EE. Reduced virulence of melanized *Cryptococcus neoformans* in *Galleria mellonella*. *Virulence.* 2014;5(5):611–8. doi: 10.4161/viru.29234. PMID: 24846144.

Ellerbroek PM, Hoepelman AIM, Wolbers F, Zwaginga JJ, Coenjaerts FEJ. Cryptococcal glucuronoxylomannan inhibits adhesion of neutrophils to stimulated endothelium in vitro by affecting both neutrophils and endothelial cells. *Infect Immun.* 2002;70(9):4762–71. doi: 10.1128/IAI.70.9.4762-4771.2002. PMID: 12183517.

Espinel-Ingroff A, Aller AI, Canton E, Castañón-Olivares LR, Chowdhary A, Cordoba S, et al. *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* Species Complex: an International Study of Wild-Type Susceptibility Endpoint Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(11):5898–906. doi: 10.1128/aac.01115-12. PMID: 22948877.

Espinel-Ingroff A, Turnidge J. The role of epidemiological cutoff values (ECVs/ECOFFs) in antifungal susceptibility testing and interpretation for uncommon yeasts and moulds. *Rev Iberoam Micol.* 2016;33(2):63–75. doi: 10.1016/j.riam.2016.04.001. PMID: 27296911.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [Internet]. Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents [cited 2020 Feb 04]. Available from: <https://www.eucast.org/astoffungi/clinicalbreakpointsforantifungals/>.

Favalessa OC, de Paula DAJ, Dutra V, Nakazato L, Tadano T, Lazera M dos S, et al. Molecular typing and in vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus* spp from patients in Midwest Brazil. *J Infect Dev Ctries*. 2014;8(8):1037–43. doi: 10.3855/jidc.4446.

Feldmesser M, Kress Y, Casadevall A. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. *Microbiology*. 2001;147(8):2355–65. doi: 10.1099/00221287-147-8-2355. PMID: 11496012.

Feng X, Fu X, Ling B, Wang L, Liao W, Yao Z. Development of a singleplex PCR assay for rapid identification and differentiation of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, *Cryptococcus gattii*, and hybrids. *J Clin Microbiol*. 2013;51(6):1920–3. doi: 10.1128/JCM.00064-13. PMID: 23536400.

Fernandes KE, Weeks K, Carter DA. Lactoferrin is broadly active against yeasts and highly synergistic with amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020 Apr 21;64(5):e02284 - 19. doi: 10.1128/AAC.02284-19.

Firacative C, Duan S, Meyer W. *Galleria mellonella* model identifies highly virulent strains among all major molecular types of *Cryptococcus gattii*. *PLoS One*. 2014 Aug 18;9(8):e105076. doi: 10.1371/journal.pone.0105076. PMID: 25133687; PMCID: PMC4136835.

Firacative C, Khan A, Duan S, Ferreira-Paim K, Leemon D, Meyer W. Rearing and maintenance of *Galleria mellonella* and its application to study fungal virulence. *J Fungi*. 2020;6(3):1–13. doi: 10.3390/jof6030130. PMID: 32784766.

Firacative C, Lizarazo J, Illnait-Zaragozí MT, Castañeda E, Latin American Cryptococcal Study Group. The status of cryptococcosis in Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(7):e170554. doi: 10.1590/0074-02760170554. Epub 2018 Apr 5. PMID: 29641639; PMCID: PMC5888000.

Fuchs BB, Mylonakis E. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. *Curr Opin Microbiol*. 2006;9(4):346–51. doi: 10.1016/j.mib.2006.06.004. PMID: 16814595.

Fuchs BB, O'Brien E, Khoury JBE, Mylonakis E. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence*. 2010;1(6):475–82. doi: 10.4161/viru.1.6.12985. PMID: 21178491.

García-Rodas R, Casadevall A, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O. *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement and cellular gigantism during *Galleria mellonella* infection. *PLoS One*. 2011;6(9):e24485. doi: 10.1371/journal.pone.0024485. Epub 2011 Sep 7. PMID: 21915338; PMCID: PMC3168503.

Grossman NT, Casadevall A. Physiological differences in *Cryptococcus neoformans* strains in vitro versus in vivo and their effects on antifungal susceptibility 2017;61(3):1–12. doi: 10.1128/AAC.02108-16. PMID: 28031206.

Guidelines for The Diagnosis, Prevention and Management of Cryptococcal Disease in HIV-Infected Adults, Adolescents and Children: Supplement to the 2016 Consolidated Guidelines on the Use of Antiretroviral Drugs for Treating and Preventing HIV Infection. Geneva: World Health Organization; 2018 Mar. PMID: 30285342.

Guinea J, Hagen F, Peláez T, Boekhout T, Tahoune H, Torres-Narbona M, et al. Antifungal susceptibility, serotyping, and genotyping of clinical *Cryptococcus neoformans* isolates collected during 18 years in a single institution in Madrid, Spain. *Med Mycol*. 2010;48(7):942–8. doi: 10.3109/13693781003690067. PMID: 20297948.

Hagen F, Illnait-Zaragozí MT, Meis JF, Chew WHM, Curfs-Breuker I, Mouton JW, et al. Extensive genetic diversity within the Dutch clinical *Cryptococcus neoformans* population. *J Clin Microbiol*. 2012;50(6):1918–26. doi: 10.1128/JCM.06750-11. PMID: 22442325.

Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Kolečka A, Polacheck I, Sionov E, et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol*. 2015;78:16–48. doi: 10.1016/j.fgb.2015.02.009. PMID: 25721988.

Hagen F, Lumbsch HT, Arsic Arsenijevic V, Badali H, Bertout S, Billmyre RB, et al. Importance of resolving fungal nomenclature: the case of multiple pathogenic species in the *Cryptococcus* genus. *MSphere*. 2017;2(4):1–13. doi: 10.1128/msphere.00238-17.

Hansakon A, Ngamskulrungron P, Angkasekwinai P. Contribution of laccase expression to immune response against *Cryptococcus gattii* infection. *Infect Immun*. 2019;88(3):712–9. doi: 10.1128/IAI.00712-19. PMID: 31871099.

Henao-Martínez AF, Chastain DB, Franco-Paredes C. Treatment of cryptococcosis in non-HIV immunocompromised patients. *Curr Opin Infect Dis*. 2018;31(4):278–85. doi: 10.1097/QCO.0000000000000458. PMID: 29738314.

Herkert PF, Meis JF, de Oliveira Salvador GL, Gomes RR, Vicente VA, Muro MD, et al. Molecular characterization and antifungal susceptibility testing of *cryptococcus neoformans sensu Stricto* from southern Brazil. *J Med Microbiol*. 2018;67(4):560–9. doi: 10.1099/jmm.0.000698. PMID: 29461182.

Hommel B, Mukaremera L, Cordero RJB, Coelho C, Desjardins CA, Sturny-Leclère A, et al. Titan cells formation in *Cryptococcus neoformans* is finely tuned by environmental conditions and modulated by positive and negative genetic regulators. *PLoS Pathog*. 2018 May 18;14(5):e1006982. doi: 10.1371/journal.ppat.1006982. PMID: 29775480; PMCID: PMC5959062.

Hubrecht RC, Carter E. The 3Rs and humane experimental technique: Implementing change. *Animals*. 2019;9(10):1–10. doi: 10.3390/ani9100754. PMID: 31575048.

Jorjão AL, Oliveira LD, Scorzoni L, Figueiredo-Godoi LMA, Prata MCA, Jorge AOC, et al. From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for in vivo microbiological studies. *Virulence*. 2018;9(1):383–9. doi: 10.1080/21505594.2017.1397871. PMID: 29130369.

Junqueira JC. *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence*. 2012;3(6):474–6. doi: 10.4161/viru.22493. PMID: 23211681.

Klein KR, Hall L, Deml SM, Rysavy JM, Wohlfiel SL, Wengenack NL. Identification of *Cryptococcus gattii* by use of L-canavanine glycine bromothymol blue medium and DNA sequencing. *J Clin Microbiol*. 2009;47(11):3669–72. doi: 10.1128/JCM.01072-09. PMID: 19794048.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Wickes BL, Meyer W, Cuomo CA, Wollenburg KR, et al. The case for adopting the “species complex” nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis. *MSphere*. 2017;2(1):1–7. doi: 10.1128/msphere.00357-16.

Lamb DC, Corran A, Baldwin BC, Kwon-Chung J, Kelly SL. Resistant P45051A1 activity in azole antifungal tolerant *Cryptococcus neoformans* from AIDS patients. *FEBS Lett*. 1995;368(2):326–30. doi: 10.1016/0014-5793(95)00684-2. PMID: 7628631.

Lehninger A. Principles of biochemistry. 7 ed. New York: Worth Publications; 2018.

Liu WO, Chun CD, Chow ED, Chen C, Madhani HD NS. Systematic genetic analysis of virulence in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Bone*. 2008;23(1):1–7. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.046. PMID: 18854164.

Loh JMS, Adenwalla N, Wiles S, Proft T. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. *Virulence*. 2013;4(5):419–28. doi: 10.4161/viru.24930.

Lozano-Chiu M, Paetznick VL, Ghannoum MA, Rex JH. Detection of resistance to amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* clinical isolates: performances of three different media assessed by using E- test and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A methodologies. *J Clin Microbiol*. 1998;36(10):2817–22. doi: 10.1128/JCM.36.10.2817-2822.1998. PMID: 9738026.

Luo G, Mitchell TG. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2002;40(8):2860–5. doi: 10.1128/JCM.40.8.2860-2865.2002. PMID: 12149343.

Ma Q, Yao J, Yuan S, Liu H, Wei N, Zhang J, et al. Development of a lateral flow recombinase polymerase amplification assay for rapid and visual detection of *Cryptococcus neoformans*/C. *gattii* in cerebral spinal fluid. *BMC Infect Dis*. 2012;19(1):319–27. doi: 10.1186/s12879-019-3744-6.

- Martinez LR, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV light. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(14):4592–601. doi: 10.1128/AEM.02506-06. PMID: 17513597.
- Martinez LR, Casadevall A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(3):1021–33. doi: 10.1128/AAC.50.3.1021-1033.2006. PMID: 16495265.
- Martinez LR, Casadevall A. Specific antibody can prevent fungal biofilm formation and this effect correlates with protective efficacy. *Infect Immun*. 2005;73(10):6350–62. doi: 10.1128/IAI.73.10.6350-6362.2005. PMID: 16177306.
- Matos CS, De Souza Andrade A, Oliveira NS, Barros TF. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus* spp. in Bahia, Brazil: Molecular types and antifungal susceptibilities. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(7):1647–52. doi: 10.1007/s10096-011-1488-3. PMID: 22278291.
- Maxson ME, Dadachova E, Casadevall A, Zaragoza O. Radial mass density, charge, and epitope distribution in the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Eukaryot Cell*. 2007;6(1):95–109. doi: 10.1128/EC.00306-06. PMID: 17114596.
- May RC, Neil RHS, Wiesner DL, Bicanic T, Kirsten N. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen Robin. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(2):106–17. doi: 10.1038/nrmicro.2015.6. PMID: 26685750.
- McFadden DC, Fries BC, Wang F, Casadevall A. Capsule structural heterogeneity and antigenic variation in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*. 2007;6(8):1464–73. doi: 10.1128/EC.00162-07.
- Molloy SF, Chiller T, Greene GS, Burry J, Govender NP, Kanyama C, et al. Cryptococcal meningitis: A neglected NTD? *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(6):e0005575. doi: 10.1371/journal.pntd.0005575.
- Monari C, Bistoni F, Vecchiarelli A. Glucuronoxylomannan exhibits potent immunosuppressive properties. *FEMS Yeast Res*. 2006;6(4):537–42. doi: 10.1111/j.1567-1364.2006.00072.x. PMID: 16696649.
- Mourad A, Perfect JR. Present and Future therapy of cryptococcus infections. *J Fungi (Basel)*. 2018 Jul 3;4(3):79. doi: 10.3390/jof4030079. PMID: 29970809; PMCID: PMC6162641.
- Murphy JW, Cozad GC. Immunological unresponsiveness induced by cryptococcal capsular polysaccharide assayed by the hemolytic plaque technique. *Infect Immun*. 1972;5(6):896–901. doi: 10.1128/iai.5.6.896-901.1972. PMID: 4564405.
- Mylonakis E, Ausubel FM, Perfect JR, Heitman J, Calderwood SB. Killing of

Caenorhabditis elegans by Cryptococcus neoformans as a model of yeast pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15675–80. doi: 10.1073/pnas.232568599. PMID: 12438649.

Mylonakis E, Moreno R, Joseph B, El Khoury AI, Heitman J, Stephen B, et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;73(7):3842–50. doi: 10.1128/IAI.73.7.3842-3850.2005. PMID:15972469.

Ngamskulrungrroj P, Gilgado F, Faganello J, Litvintseva AP, Leal AL, Tsui KM, et al. Genetic diversity of the *Cryptococcus* species complex suggests that *Cryptococcus gattii* deserves to have varieties. *PLoS One*. 2009 Jun 10;4(6):e5862. doi: 10.1371/journal.pone.0005862. Erratum in: *PLoS One*. 2009;4(7). doi: 10.1371/annotation/3037bb69-1b8e-4d99-b169-afdf4b74ace2. Erratum in: *PLoS One*. 2009;4(7). doi: 10.1371/annotation/348c3375-3918-4e41-bb8c-27aa15d2bdc4. PMID: 19517012; PMCID: PMC2690690.

O'Meara TR, Andrew Alspaugh J. The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(3):387–408. doi: 10.1128/CMR.00001-12. PMID: 22763631.

Okagaki LH, Nielsen K. Titan cells confer protection from phagocytosis in *Cryptococcus neoformans* infections. *Eukaryot Cell*. 2012;11(6):820–6. doi: 10.1128/EC.00121-12. PMID: 22544904.

Okagaki LH, Strain AK, Nielsen JN, Charlier C, Baltes NJ, Chrétien F, et al. *Cryptococcal* cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. *PLoS Pathog*. 2010 Jun 17;6(6):e1000953. doi: 10.1371/journal.ppat.1000953. Erratum in: *PLoS Pathog*. 2010;6(6). doi: 10.1371/annotation/1b59fd9e-9ac9-4ea8-a083-14c413c80b03. PMID: 20585559; PMCID: PMC2887476.

Oliveira DL, Freire-de-Lima CG, Nosanchuk JD, Casadevall A, Rodrigues ML, Nimrichter L. Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. *Infect Immun*. 2010;78(4):1601–9. doi: 10.1128/IAI.01171-09. PMID: 20145096.

Oliveira-Neto IC, Machado CC, Wagner MB, Severo LC. Meio século de criptococose no Brasil: revisão de 308 casos (1941-1992). *Amb Hosp*. 1993;7;5-16. doi.org/10.1590/S0036-46652003000600001.

Palma BF, Ferrari AB, Bitar RA, Cardoso AG, Martin AA, Martinho S. Sistemática de extração de DNA para estudos via espectroscopia Raman. XI Encontro Lat Am Iniciação Científica. Outubro, 2007; São José dos Campos. 2004:527–30.

Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods*. 2008;72(2):157–65. doi: 10.1016/j.mimet.2007.11.010. PMID: 18155789.

Pharkjaksu S, Chongtrakool P, Chayakulkeeree M, Mitrpant C, Angkasekwina P, Bennett JE, et al. *Cryptococcus neoformans/gattii* species complexes from pre-hiv pandemic era contain unusually high rate of non-wild-type isolates for amphotericin B. *Infect Drug Resist*. 2020;13(26):673–81. doi: 10.2147/IDR.S235473. PMID: 32161475.

Ponzio V, Chen Y, Rodrigues AM, Tenor JL, Toffaletti DL, Medina-Pestana JO, et al. Genotypic diversity and clinical outcome of cryptococcosis in renal transplant recipients in Brazil. *Emerg Microbes Infect*. 2019;8(1):119–29. doi: 10.1080/22221751.2018.1562849. PMID: 30866766.

Pukkila-Worley R, Gerrald QD, Kraus PR, Boily MJ, Davis MJ, Giles SS, et al. Transcriptional network of multiple capsule and melanin genes governed by the *Cryptococcus neoformans* cyclic AMP cascade. *Eukaryot Cell*. 2005;4(1):190–201. doi: 10.1128/EC.4.1.190-201.2005. PMID: 15643074.

Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, Jarvis JN, Govender NP, Chiller TM, et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(8):873–81. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30243-8. PMID: 28483415.

Reese AJ, Yoneda A, Breger JA, Beauvais A, Liu H, Cara L, et al. Loss of cell wall $\alpha(1\text{--}3)$ glucan affects *Cryptococcus neoformans* from ultrastructure to virulence. *Mol Microbiol*. 2007 Mar;63(5):1385–1398. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05551.x. PMID: 17244196.

Revankar SG, Fu J, Rinaldi MG, Kelly SL, Kelly DE, Lamb DC, et al. Cloning and characterization of the lanosterol 14α -demethylase (ERG11) gene in *Cryptococcus neoformans*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;324(2):719–28. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.09.112. PMID: 15474487.

Rodrigues ML. Funding and innovation in diseases of neglected populations: the paradox of cryptococcal meningitis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(3):2–5. doi: 10.1371/journal.pntd.0004429. PMID: 26964103.

Rolfes MA, Hullsiek KH, Rhein J, Nabeta HW, Taseera K, Schutz C, et al. The effect of therapeutic lumbar punctures on acute mortality from cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis*. 2014;59(11):1607–14. doi: 10.1093/cid/ciu596. PMID: 25057102.

Römling U, Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J Intern Med*. 2012;272(6):541–61. doi: 10.1111/joim.12004. PMID: 23025745.

Sabiiti W, May RC, Pursall ER. Experimental models of cryptococcosis. *Int J Microbiol*. 2012;2012:626745. doi: 10.1155/2012/626745. Epub 2011 Oct 6. PMID: 22007224; PMCID: PM C3189605.

Sabiiti W, Robertson E, Beale MA, Johnston SA, Brouwer AE, Loyse A, et al. Efficient phagocytosis and laccase activity affect the outcome of HIV-associated

cryptococcosis. J Clin Invest. 2014;124(5):2000–8. doi: 10.1172/JCI72950. PMID: 24743149.

Saha DC, Xess I, Biswas A, Bhowmik DM, Padma M V. Detection of *Cryptococcus* by conventional, serological and molecular methods. J Med Microbiol. 2009;58(8):1098–105. doi: 10.1099/jmm.0.007328-0. PMID: 19528182.

Saijo T, Chen J, Chen SC, Rosen LB, Yi J, Sorrell TC, et al. Anti-Granulocyte-Anti-Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Autoantibodies Are a Risk Factor for Central Nervous System Infection by *Cryptococcus gattii* in Otherwise Immunocompetent Patients. MBio. 2014;5(2):1–8. doi: 10.1128/mBio.00912-14. PMID: 24643864.

Siqueira LPM, Gimenes VMF, Freitas RS, Melhem M de SC, Bonfietti LX, Silva AR, et al. Evaluation of Vitek MS for differentiation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* genotypes. J Clin Microbiol. 2019;57(1):1–7. doi: 10.1128/JCM.01282-18. PMID: 30429250.

Spadari C, Bastiani F, Pisani P, Melo A, Ishida K. Efficacy of voriconazole in vitro and in invertebrate model of cryptococcosis. Arch Microbiol. 2020;202(4):773–84. doi: 10.1007/s00203-019-01789-8. PMID: 31832690.

Spina-Tensini T, Muro MD, Queiroz-Telles F, Strozzi I, Moraes ST, Petterle RR, et al. Geographic distribution of patients affected by *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complexes meningitis, pigeon and tree populations in Southern Brazil. Mycoses. 2017;60(1):51–8. doi: 10.1111/myc.12550. PMID: 27561904.

Stephen C, Lester S, Black W, Fyfe M, Raverty S. Multispecies outbreak of cryptococcosis on southern Vancouver Island, British Columbia. Can Vet J. 2002;43(10):792–4. PMID: 12395765.

Stevenson B, Bundell C, Mulrennan S, McLean-Tookey A, Murray R, Bruschi A. The significance of anti-granulocyte-macrophage colony-stimulating factor antibodies in cryptococcal infection: case series and review of antibody testing. Intern Med J. 2019;49(11):1446–50. doi: 10.1111/imj.14637. PMID: 31713345.

Tanaka KI, Miyazaki T, Maesaki S, Mitsutake K, Kakeya H, Yamamoto Y, et al. Detection of *Cryptococcus neoformans* gene in patients with pulmonary cryptococcosis. J Clin Microbiol. 1996;34(11):2826–8. doi: 10.1128/jcm.34.11.2826-2828.1996. PMID: 8897191.

Tavares ER, Gionco B, Morguette AEB, Andriani GM, Morey AT, do Carmo AO, et al. Phenotypic characteristics and transcriptome profile of *Cryptococcus gattii* biofilm. Sci Rep. 2019;9(1):1–14. doi: 10.1038/s41598-019-42896-2. PMID: 31015652.

Thammasit P, Iadnut A, Mamoon K, Khacha-ananda S, Chupradit K, Tayapiwatana C, et al. A potential of propolis on major virulence factors of

Cryptococcus neoformans. *Microb Pathog*. 2018;123:296–303. doi: 10.1016/j.micpath.2018.07.028.

Trevijano-Contador N, Herrero-Fernández I, García-Barbazán I, Scorzoni L, Rueda C, Rossi SA, et al. *Cryptococcus neoformans* induces antimicrobial responses and behaves as a facultative intracellular pathogen in the non mammalian model *Galleria mellonella*. *Virulence*. 2015;6(1):66–74. doi: 10.4161/21505594.2014.986412. PMID: 25531532.

Trevijano-Contador N, de Oliveira HC, García-Rodas R, Rossi SA, Llorente I, Zaballos Á, et al. *Cryptococcus neoformans* can form titan-like cells in vitro in response to multiple signals. *PLoS Pathog*. 2018 May 18;14(5):e1007007. doi: 10.1371/journal.ppat.1007007. PMID: 29775477; PMCID: PMC5959073.

Trilles L, Lazéra MDS, Wanke B, Oliveira RV, Barbosa GG, Nishikawa MM, et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103(5):455–62. doi: 10.1590/S0074-02762008000500008.

Velez N, Alvarado M, Parra-Giraldo CM, Sánchez-Quitian ZA, Escandón P, Castañeda E. Genotypic diversity is independent of pathogenicity in colombian strains of *cryptococcus neoformans* and *cryptococcus gattii* in *galleria mellonella*. *J Fungi (Basel)*. 2018 Jul 5;4(3):82. doi: 10.3390/jof4030082. PMID: 29976849; PMCID: PMC6162678.

Venkateswarlu K, Taylor M, Manning NJ, Rinaldi MG, Kelly SL. Fluconazole tolerance in clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41(4):748–51. doi: 10.1128/AAC.41.4.748. PMID: 9087482.

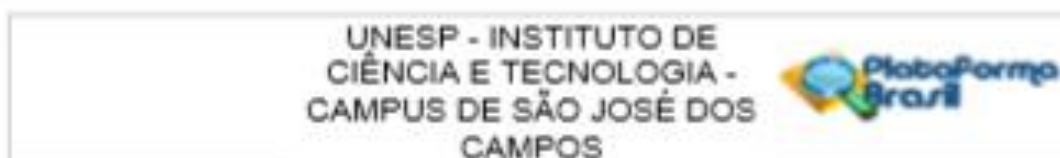
Williamson PR. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: Identification as a laccase. *J Bacteriol*. 1994;176(3):656–64. doi: 10.1128/jb.176.3.656-664.1994. PMID: 8300520.

Zaragoza O, Casadevall A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. *Biol Proced Online*. 2004;6(1):10–5. doi: 10.1251/bpo68. PMID: 15103395.

Zaragoza O, Nielsen K. Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: Cells with a giant impact. *Curr Opin Microbiol*. 2013;16(4):409–13. doi: 10.1016/j.mib.2013.03.006. PMID: 23588027.

Zaragoza O, Rocío GR, Nosanchuk JD, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL, Casadevall A. Fungal cell gigantism during mammalian infection. *PLoS Pathog*. 2010;6(6). doi: 10.1371/journal.ppat.1000945. PMID: 20585557.

ANEXO — Parecer consubstanciado do Comitê de Ética para utilização de amostras biológicas de pacientes infectados por *Cryptococcus* spp



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Atividade anti - *Cryptococcus* spp. de biblioteca de compostos com capacidade de penetração no Sistema Nervoso Central: Avaliação do sinergismo com antifúngicos e estudo in vivo em *C. elegans*.

Pesquisador: LILIANA SCORZONI

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 22346619.9.0000.0077

Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.641.351

Apresentação do Projeto:

O projeto está bem elaborado, descrito com clareza e embasamento científico.

Objetivo da Pesquisa:

1. Utilizando uma biblioteca composta por 362 compostos os quais possuem a capacidade de atravessar as barreiras cerebrais pretende-se realizar triagem e encontrar compostos pertencentes a biblioteca de compostos que sejam ativos para *C. neoformans* (cepa padrão ATCC). Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) desses compostos.
2. Confirmar a identificação das espécies dos isolados clínicos cedidos pelos laboratórios participantes por métodos clássicos e por biologia molecular. Caracterizar a sensibilidade desses isolados aos antifúngicos fluconazol e anfotericina B.
3. Ampliar os ensaios com as substâncias ativas encontradas na biblioteca de compostos com os isolados clínicos cuja identificação foi confirmada como *C. neoformans* e *C. gatii*.
4. Avaliar o sinergismo dos compostos pertencentes a bibliotecas ativos frente a *Cryptococcus* spp., com anfotericina B e fluconazol.

Endereço: Av. Eng.º Francisco José Longo, 777
Cidade: Jardim São Dias **CEP:** 12.245-000
UF: SP **Município:** SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-8078 **Fax:** (12)3947-8010 **E-mail:** cep@ict@unesp.br

**UNESP - INSTITUTO DE
CIÊNCIA E TECNOLOGIA -
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS
CAMPOS**



Continuação do Parecer: 2016.1.026

5. Além disso, tem-se o intuito determinar a ação desses compostos sozinhos e em combinação em mecanismos de virulência de *Cryptococcus* spp. os quais são considerados potenciais alvos por não serem encontrados em humanos (cápsula polissacarídica, melanização, parede celular e formação de biofilme).

Em relação aos ensaios *in vivo* em *C. elegans* propostos neste projeto pretende-se:

1. Analisar a toxicidade de compostos e combinações por meio de curvas de sobrevivência, atraso no consumo de *E. coli* e redução/ ausência na postura de ovos.
2. Além disso, espera-se que os fármacos (com atividade antifúngica *in vitro*) não sejam tóxicos nesse modelo.
3. Encontrar compostos e combinações que sejam eficazes *in vivo* através de análises de curva de sobrevivência, redução no número de unidades formadoras de colônia.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Identificação equivocada do micro-organismo.

Benefícios: Opção de tratamentos menos tóxicos e mais eficazes para o paciente. Melhor entendimento da patogenia, mecanismos de virulência e relação parasita-hospedeiro.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é exequível no ICT-UNESP e a combinação desses novos compostos com antifúngicos tradicionais seriam estratégias interessantes na busca de tratamentos para a cryptococose. O modelo *C. elegans* que será utilizado para os ensaios *in vivo* permitirá a triagem de grande número de composto além de permitir a análise da toxicidade e eficácia de novos tratamentos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos foram apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado acata o parecer do(a) Relator(a).

O (a) pesquisador(a) irá receber e-mail da Secretaria do CEP-ICT-CAMPUS DE SJCAMPOS-UNESP, para envio de relatórios parciais/final, para não incorrer na penalidade de não o fazendo, em não

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777	
Bairro: Jardim São Diniz	CEP: 12.245-000
UF: SP	Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9076	Fax: (12)3947-9010 E-mail: cep.ict@unesp.br

**UNESP - INSTITUTO DE
CIÊNCIA E TECNOLOGIA -
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS
CAMPOS**



Continuação do Parecer: 2 de 1,264

ter novas submissões avaliada pelo Comitê de Ética, até que sane a pendência de envio do relatório, na forma de notificação através do sistema da Plataforma Brasil. Obs:- No site <https://www2.icl.unesp.br/> – Sobre o ICT – Comissões e Comitês - Comitê de Ética Envolvendo Seres Humanos, encontrará o formulário para envio do Relatório parcial/final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PI- INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO_1437054.pdf	23/09/2019 16:04:34		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DETALHADO.pdf	23/09/2019 16:03:42	LILIANA SCORZONI	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	23/09/2019 16:00:45	LILIANA SCORZONI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa da Ausência	termos_cessao.pdf	23/09/2019 16:00:23	LILIANA SCORZONI	Aceito
Brochura Pesquisa	PROJETO_BROCHURA.pdf	23/09/2019 15:58:25	LILIANA SCORZONI	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto_.pdf	23/09/2019 15:58:34	LILIANA SCORZONI	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO JOSE DOS CAMPOS, 15 de Outubro de 2019

Assinado por:
Denise Nicodemo
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Diniz CEP: 12.245-000
UF: SP Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9079 Fax: (12)3947-9010 E-mail: cep@icl.unesp.br