

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA**



Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

TATIANE BENADUCCI

**SENSIBILIDADE DE BIOFILMES DE *Cryptococcus* VNI E VGII À
ANFOTERICINA B E MAITENINA**

Araraquara
2013

TATIANE BENADUCCI

**SENSIBILIDADE DE BIOFILMES DE *Cryptococcus* VNI E VGII À
ANFOTERICINA B E MAITENINA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Araraquara, como pré-requisito para obtenção do título de doutor em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração: Micologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria José Soares Mendes Giannini

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Marisa Fusco-Almeida

Araraquara
2013

-
- Benaducci, Tatiane.
- B456s** Sensibilidade de biofilmes de *Cryptococcus* VNI e VGII à Anfotericina B e maitenina / Tatiane Benaducci. – Araraquara: [S.n.], 2013.
149 f. : il.
- Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração: Micologia.
- Orientador: Maria José Soares Mendes Giannini. Coorientadora:
Ana Marisa Fusco-Almeida.
1. *Cryptococcus spp.* 2. Biofilmes. 3. Concentração inibitória mínima (CIM).
4. Maitenina. 5. *Galleria mellonella*. I. Mendes Giannini, Maria José Soares,
orient. II. Fusco-Almeida, Ana Marisa, coorient. III. Título.
-

TATIANE BENADUCCI

SENSIBILIDADE DE BIOFILMES DE *Cryptococcus* VNI E VGII À ANFOTERICINA B E MAITENINA

Tese de Doutorado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como parte dos requisitos para o título de Doutor em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração: Bioquímica.

Araraquara, 30 de agosto de 2013.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini
Orientador e Presidente da Comissão Examinadora

Profa. Dra. Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola
Membro Titular

Profa. Dra. Márcia dos Santos Lazera
Membro Titular

Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan
Membro Titular

Profa. Dra. Janaína de Cássia Orlandi Sardi
Membro Titular

Dedico este trabalho...

Ao meu pai, Pedro, meu maior mestre desde o princípio, ídolo de todo o sempre, incentivador do meu crescimento e sucesso. À minha mãe, Maria Arlene, fundamental em minha vida, sempre ao meu lado, me apoiando e me assegurando em todas as circunstâncias. Às minhas irmãs, Daiane e Josiane, minhas melhores amigas, que são 2/3 de mim. Uma continuação do meu ser, do meu viver e do meu existir...

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, por ter guiado os meus caminhos até aqui, iluminado a minha mente e o meu ser, dando a chance de viver momentos maravilhosos e inesquecíveis de minha vida. Por ter me dado força nos momentos mais difíceis... E por muitas noites ter sido O ÚNICO a ter conseguido me acalmar de verdade!

À Prof^ª Dr^a Maria José Soares Mendes Giannini, minha orientadora, pelo exemplo de liderança, profissionalismo, perseverança e idealismo. Obrigado por exigir e cobrar sempre o meu melhor. Obrigado pela oportunidade de crescimento, por me abrir as portas de lugar que fez tão bem pra mim. Há 10 anos, em julho de 2003, eu entrava cheia de sonhos e hoje sigo meu caminho rodeada de esperanças... Obrigada pelos ensinamentos e lições que carregarei comigo por toda vida.

À Prof^ª Dr^a Ana Marisa Fusco Almeida, minha co-orientadora, pelo exemplo de força de vontade, por estar sempre à disposição e principalmente pelo carinho. Obrigada por ser a minha grande incentivadora de iniciar os passos na pós-graduação, por ter sido a primeira pessoa a fazer-me apaixonar por fungos, por me trazer para Araraquara, cidade que me acolheu e tantas coisas boas me trouxeram.

À Dr^a Márcia Prata, da EMBRAPA de Juiz de Fora - MG, que gentilmente nos forneceu *Galleria mellonella* para iniciarmos os experimentos até que não tivéssemos nossa própria produção.

Meus pais, Pedro e Arlene, que me ensinaram a ser forte, a manter a cabeça erguida, a nunca ganhar nem perder, mas procurar evoluir... Protegeram-me quando eu precisei, mas me deixaram resolver os meus problemas... Assistiam de longe os meus tropeços e seguraram as minhas mãos e me ajudaram a levantar... São meus maiores e melhores conselheiros... Estão sempre ao meu lado, estando eu certa ou errada, mas me mostram o caminho sem perder o carinho e a compreensão. A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus. Obrigada por toda a educação e exemplo. Obrigada pela família linda pela qual faço parte. Obrigada por mais essa conquista!

Minhas irmãs... Daiane e Josiane, extensões do meu eu! Obrigada por me fazer uma pessoa melhor a cada dia... Obrigada por me ajudarem nos momentos de preocupações e angústias... Obrigada por estarem ao meu lado nas minhas maiores conquistas e nos momentos mais felizes... Obrigada principalmente a você Daiane, por dividir pelo menos três apartamentos comigo em oito anos e meio de um “casamento” bem vivido, que apesar dos pesares soubemos

realizá-lo com harmonia... Enfim, não canso de agradecer a Deus o maior presente que já recebi... Fazer parte de uma família tão maravilhosa e especial!

Aos meus amigos: Natália (por sempre estar ao meu lado me auxiliando em todos os experimentos), Liliana (que com muita paciência me ensinou e ajudou com os experimentos com *G. mellonella*), Suélem (que me incentivou a trabalhar com expressão gênica), Jaqueline (que foi fundamental me ajudando no preparo das placas de *Real Time*), Aline e Haroldo (que me ajudaram a desenhar os iniciadores), Janaína (por todas as madrugadas adentro, pela companhia, paciência, por muitas vezes me acalmar no desespero, pela ajuda na escrita, pelas discussões, obrigada, obrigada, obrigada!), Nayla (pela ajuda com os protocolos de microscopia), Fernanda Gullo (por todo apoio em todos os experimentos, pela ajuda na escrita, e por todos os nossos debates de *Cryptococcus* spp.) e a Danielle (que mesmo de longe estava mais presente que nunca, minha “irmã” querida que tanto amo).

Às amigas Márcia e Rosemira, porteiras ou não, obrigada pelo sorriso logo pela manhã, por todos os deliciosos pratos e receitas feitas por vocês na cozinha, e principalmente, obrigadas pela torcida mesmo que de longe...

Aos meus amigos da Micologia... Àqueles que quando cheguei, já faziam parte do laboratório e já se foram, àqueles que estiveram comigo por pouco tempo, pois estavam de passagem por lá... Aos que ainda permanecem desde que entrei e aos que estão chegando agora... Muito obrigada por dividir absolutamente tudo comigo, mesmo que este tudo seja apenas o tempo e o espaço. Obrigada pelos momentos felizes em volta de uma mesa ou de uma cozinha com muita comida (Festas Juninas, aniversários, churrascos, amigos secretos e até enfeitando o laboratório para a chegada do Natal), os momentos de conversa, de desespero, de choro, de querer desistir... Obrigada por me ensinarem a respeitar a individualidade de cada um e a conviver em grupo, e aproveitar o que cada um pode te oferecer de melhor... Obrigada àqueles que me ajudaram no trabalho dia-a-dia e principalmente àqueles que estenderam a mão no meu pedido de socorro! Esses eu sei que posso levar no coração e contar com eles por toda a vida...

Em especial à uma parceira de vida, Vânia Ortega, que nos últimos 6 anos, não deixou de perguntar, irritar, e aguentar a grosseria de um coração magoado. A você minha amiga, muito obrigada por finalmente me auxiliar no psicológico e entrega da versão final depois de 8 anos de defesa deste doutorado!

Quando me amei de verdade

Quando me amei de verdade compreendi que em qualquer circunstância, eu estava no lugar certo, na hora certa, no momento exato. E então, pude relaxar.

Hoje sei que isso tem nome... Auto-estima.

Quando me amei de verdade pude perceber que minha angústia, meu sofrimento emocional, não passa de um sinal de que estou indo contra minhas verdades.

Hoje sei que isso é... Autenticidade.

Quando me amei de verdade parei de desejar que a minha vida fosse diferente e comecei a ver que tudo o que acontece contribui para o meu crescimento.

Hoje chamo isso de... Amadurecimento.

Quando me amei de verdade comecei a perceber como é ofensivo tentar forçar alguma situação ou alguém, apenas para realizar aquilo que desejo, mesmo sabendo que não é o momento ou a pessoa não está preparada, inclusive eu mesmo.

Hoje sei que o nome disso é... Respeito.

Quando me amei de verdade comecei a me livrar de tudo que não fosse saudável...

Pessoas, tarefas, tudo e qualquer coisa que me pusesse para baixo.

De início minha razão chamou essa atitude de egoísmo.

Hoje sei que se chama... Amor próprio.

Quando me amei de verdade, deixei de temer o meu tempo livre e desisti de fazer grandes planos, abandonei os projetos megalômanos de futuro. Hoje faço o que acho certo, o que gosto, quando quero e no meu próprio ritmo.

Hoje sei que isso é... Simplicidade.

Quando me amei de verdade, desisti de querer sempre ter razão e, com isso, errei muitas menos vezes.

Hoje descobri a... Humildade.

Quando me amei de verdade, desisti de ficar revivendo o passado e de preocupar com o futuro.

Agora, me mantenho no presente, que é onde a vida acontece.

Hoje vivo um dia de cada vez. Isso é... Plenitude.

Quando me amei de verdade, percebi que minha mente pode me atormentar e me decepcionar.

Mas quando a coloco a serviço do meu coração, ela se torna uma grande e valiosa aliada.

Tudo isso é... Saber viver!

Kim e Alison McMillen

Eu não quero mais mentir
Usar espinhos que só causam dor
Eu não enxergo mais o inferno que me atraiu
Dos cegos do castelo me despeço e vou
A pé até encontrar
Um caminho, o lugar
Pro que eu sou.

Estrofe retirada da composição de Nando Reis - Os cegos do castelo

Sumário

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIACÕES

Capítulo I.....	20
1. Introdução.....	21
1.1 Infecções fúngicas invasivas.....	22
1.2 Criptococose.....	23
1.3 Taxonomia.....	26
1.4 Ecologia e epidemiologia.....	26
1.5 Virulência.....	29
1.6 Biofilmes.....	31
1.7 Estratégias terapêuticas contra <i>Cryptococcus</i> spp.	34
2. Objetivos.....	38
2.1 Objetivo Geral.....	39
2.2 Objetivos específicos.....	39
3. Material e Métodos.....	40
3.1 Microrganismos.....	41
3.2 Identificação dos isolados.....	41
3.2.1 Extração do DNA genômico das amostras.....	41
3.2.2 PCR-RFLP: Gene URA 5.....	41
3.3 Formação do biofilme.....	42
3.4 Caracterização estrutural do biofilme.....	42
3.4.1 Microscopia de Fluorescência.....	43
3.4.2 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)	43
3.4.3 Microscopia Confocal de Varredura à Laser.....	44
3.5 Atividade metabólica do biofilme.....	44
3.6 Sensibilidade de biofilmes de <i>Cryptococcus</i> spp. às drogas antifúngicas.....	45
3.6.1 Efeito das drogas antifúngicas na prevenção da formação do biofilme de <i>Cryptococcus</i> spp.....	45
3.6.2 Efeito das drogas antifúngicas em biofilmes maduros de <i>Cryptococcus</i> spp.....	45
3.6.3 Efeito das drogas antifúngicas em células planctônicas de <i>Cryptococcus</i> spp.....	45
3.7 Ensaio de morte.....	46
3.8 Análise da expressão gênica.....	46

3.8.1	Extração de RNA e síntese de cDNA.....	46
3.8.2	PCR em Tempo Real (<i>Real Time</i> PCR)	47
3.9	Teste de virulência utilizando <i>Galleria mellonella</i>	47
3.9.1	Condições de manipulação e incubação d elarvas de <i>Galleria mellonella</i>	48
3.9.2	Ensaio de sobrevivência das larvas após infecção de células planctônicas de <i>Cryptococcus</i> spp.....	48
3.9.3	Ensaio de sobrevivências da slarvas após infecção de células de <i>Cryptococcus</i> spp. raspadas do biofilme.....	48
3.10	Análise estatística.....	49
4.	Resultados.....	5
4.1	Seleção das amostras.....	51
4.1.1	Determinação da tipagem molecular por PCR-RFLP.....	51
4.2	Formação do biofilme.....	53
4.2.1	Microscopia de Fluorescência.....	53
4.2.2	MEV.....	54
4.2.3	Microscopia Confocal à Laser.....	59
4.3	Determinação da atividade metabólica do biofilme pelo ensaio de redução do XTT.....	62
4.4	Sensibilidade de <i>Cryptococcus</i> spp. a drogas antifúngicas.....	67
4.4.1	Efeito das drogas antifúngicas em células planctônicas de <i>Cryptococcus</i> spp.....	67
4.4.2	Efeito das drogas antifúngicas na prevenção da formação do biofilme de <i>Cryptococcus</i> spp.....	70
4.4.3	Efeito das drogas antifúngicas em biofilmes maduros de <i>Cryptococcus</i> spp.....	73
4.5	Comparação da atividade metabólica das células fúngicas no modo planctônico, na prevenção da formação do biofilme e em biofilmes maduros de <i>Cryptococcus</i> spp aos antifúngicos AMB e maitenina.....	76
4.6	Comparação da porcentagem de sobrevivência das células fúngicas no modo planctônico, na prevenção da formação do biofilme e em biofilmes maduros de <i>Cryptococcus</i> spp aos antifúngicos AMB e maitenina.....	84
4.7	Ensaio de sobrevivência: Modelo <i>Galleria mellonella</i>	92
4.8	Expressão gênica de <i>LACI</i> , <i>UREI</i> e <i>CAP59</i> em biofilmes e células planctônicas de <i>Cryptococcus</i> spp.....	95
5.	Discussão.....	98
6.	Conclusão.....	110
7.	Referências.....	112
8.	Apêndice.....	136
	Capítulo II.....	139

Resumo

Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii* são os patógenos fúngicos mais comumente encontrados em infecções do sistema nervoso central, causando risco de vida por meningoencefalite e seus agentes podem crescer na forma de biofilme. No tratamento desta doença há poucas opções, além da problemática de resistência que pode estar também associada à formação de biofilmes. A procura por novos agentes antifúngicos, com reações adversas reduzidas, é necessária e os produtos naturais e seus derivados podem ser opções no tratamento das principais infecções fúngicas. Os objetivos deste estudo foram analisar isolados ambientais e clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii* na forma planctônica e de biofilme, por diferentes técnicas de microscopia. Avaliar a sensibilidade a anfotericina B (AMB) e maitenina, molécula gerada a partir da planta *Maytenus ilicifolia*, bem como determinar a prevenção da formação de biofilmes, com base na análise de redução do 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5 - [carbonilo (fenilamino)]-2H-tetrazólio-hidróxido (XTT) e na determinação da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Foi analisada ainda, a virulência dos isolados ambientais e clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii*, em um modelo alternativo, a *Galleria mellonella*, e, realizada a quantificação relativa dos genes *LAC1*, *URE1* e *CAP59*, envolvidos na virulência, pelo método de PCR em tempo real. As atividades metabólicas dos biofilmes de *C. neoformans* e *C. gattii* foram reduzidas cerca de 50% após o tratamento com 32,0 mg/L de ambos os antifúngicos, AMB e maitenina, para todos os micro-organismos testados. Por outro lado, as formas planctônicas tiveram concentração inibitória mínima (CIM) entre 0,5-4,0 mg/L de maitenina para os isolados de *Cryptococcus* spp., e para AMB todos permaneceram na faixa de concentração entre 0,5-1,0 mg/L. As concentrações de maitenina encontradas neste estudo (32,0 mg/L) não foram tóxicas para células de queratinócitos (NOK). Os isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* que passaram pela formação de biofilme se mostraram mais virulentos que as planctônicas em *G. mellonella*. Para os genes *LAC1* e *URE1*, *C. gattii* apresentou níveis mais elevados de expressão ($p < 0,001$) que *C. neoformans* ($p < 0,05$), sugerindo que *C. gattii* exibiu fatores de virulência que poderiam contribuir para seu fenótipo de patógeno primário mais virulento e a condição de biofilme poderia contribuir com esse perfil. Desta maneira, nossos resultados contribuem para o melhor entendimento dos agentes da criptococose quanto aos aspectos da interação levedura-hospedeiro-antifúngico.

Palavras-chave: *Cryptococcus* spp., Biofilmes, Concentração Inibitória Mínima (CIM), Maitenina, *Galleria mellonella*.

Abstract

Cryptococcus neoformans and *Cryptococcus gattii* are a fungal pathogen most commonly found in infections of the central nervous system causing life-threatening meningoencephalitis and can grow as a biofilm. The treatment of this disease there are few options, besides the problematic of resistance that can also be associated to the formation of biofilms. The search for new antifungal agents with reduced adverse reactions is necessary and natural products and their derivatives may be options in the treatment of major fungal infections. The objectives of this study were to analyze environmental and clinical isolates of *C. neoformans* and *C. gattii* in planktonic and biofilm form, by different microscopy techniques. To evaluate the sensitivity to amphotericin B (AMB) and maytenin, a molecule generated from the plant *Maytenus ilicifolia*, as well as to determine the prevention of biofilm formation, based on the reduction analysis of 2,3-bis (2methoxy-4-nitro- 5-sulfophenyl) -5-[carbonyl (phenylamino)] - 2H-tetrazolium hydroxide (XTT) and in determining the count of colony forming units (CFU). It was also analyzed the virulence of the environmental and clinical isolates of *C. neoformans* and *C. gattii* in an alternative model, *Galleria mellonella*, and the relative quantification of *LAC1*, *URE1* and *CAP59* genes involved in virulence by the Real-time PCR. The metabolic activities of the biofilms of *C. neoformans* and *C. gattii* were reduced by approximately 50% after treatment with 32.0 mg/L of both antifungals, AMB and maytenin, for all microorganisms tested. On the other hand, planktonic forms had minimal inhibitory concentration (MIC) between 0.5-4.0 mg/L of maytenin for *Cryptococcus* spp. isolates, and for AMB all remained in the concentration range between 0.5-1.0 mg/L. The concentrations of maytenin found in this study (32.0 mg/L) were not toxic to keratinocyte cells (NOK). The isolates of *C. neoformans* and *C. gattii* that underwent biofilm formation were more virulent than planktonic in *G. mellonella*. For the *LAC1* and *URE1* genes, *C. gattii* had higher expression levels ($p < 0.001$) than *C. neoformans* ($p < 0.05$), suggesting that *C. gattii* exhibited virulence factors that could contribute to its pathogen phenotype, and the biofilm condition could contribute to this profile. In this way, our results contribute to a better understanding of the cryptococcosis agents regarding the aspects of the yeast-host-antifungal interaction.

Key-words: *Cryptococcus* spp., Biofilms, Minimal Inhibitory Concentration (MIC), maytenin, *Galleria mellonella*

Lista de tabela

Tabela 1. Identificação dos isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* por PCR-RFLP.....137

Tabela 2. Iniciadores usados para q ^{PCR} 138

Lista de Figuras

Figura 1. Perfis de PCR-RFLP dos isolados de <i>Cryptococcus</i> spp.....	52
Figura 2. Imagens de microscopia de fluorescência de biofilmes de <i>C. neoformans</i> ATCC 90112.....	54
Figura 3. Imagens de microscopia de fluorescência de biofilmes de <i>C. gattii</i> ATCC 56990.....	54
Figura 4. Eletromicrografia dos biofilmes de <i>C. neoformans</i> ATCC 90112.....	55
Figura 5. Eletromicrografia dos biofilmes de <i>C. gattii</i> ATCC 56990.....	56
Figura 6. Eletromicrografia dos biofilmes do isolado 21.2.....	57
Figura 7. Eletromicrografia dos biofilmes do isolado CER.....	58
Figura 8. Observação ao microscópio confocal a laser de células do biofilme da cepa <i>C. neoformans</i> ATCC 90112.....	60
Figura 9. Observação ao microscópio confocal a laser de células do biofilme da cepa <i>C. gattii</i> ATCC 56990.....	61
Figura 10. Imagens do microscópio óptico invertido da cinética de formação de biofilme de <i>Cryptococcus</i> spp após subseqüentes lavagens com PBS.....	63
Figura 11. Cinética da formação de biofilme por <i>Cryptococcus</i> spp. em placas de microdiluição, conforme determinado pelo ensaio de redução do XTT.....	64
Figura 12. Cinética da formação de biofilme por <i>Cryptococcus</i> spp. em placas de microdiluição, conforme determinado pela contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).....	65
Figura 13. Relação entre o ensaio de XTT e log da concentração celular avaliada a partir da contagem de UFC para o biofilme da cepa ATCC 90112.....	66
Figura 14. Células planctônicas de <i>Cryptococcus</i> spp. tratadas com AMB.....	68
Figura 15. Células planctônicas de <i>Cryptococcus</i> spp. tratadas com maitenina.....	69
Figura 16. Biofilmes em formação de <i>Cryptococcus</i> spp. tratados com AMB.....	71
Figura 17. Biofilmes em formação de <i>Cryptococcus</i> spp. tratados com maitenina.....	72
Figura 18. Biofilmes de <i>Cryptococcus</i> spp. tratados com AMB.....	74
Figura 19. Biofilmes de <i>Cryptococcus</i> spp. tratados com Maitenina.....	75
Figura 20. Porcentagem da atividade metabólica dos isolados ambientais 5.1, 21.1 e 21.2 de <i>C. neoformans</i> no modo biofilme, biofilme em formação e células planctônicas determinadas pelo ensaio de redução do sal de XTT para AMB.....	77
Figura 21. Porcentagem da atividade metabólica das amostras EAF e ATCC 90112 de <i>C. neoformans</i> no modo biofilme, biofilme em formação e células planctônicas determinadas pelo ensaio de redução do sal de XTT para AMB.....	78

Figura 22. Porcentagem da atividade metabólica das amostras CER (cérebro) e ATCC 56990 de <i>C. gattii</i> no modo biofilme, biofilme em formação e células planctônicas determinadas pelo ensaio de redução do sal de XTT para AMB.....	79
Figura 23. Porcentagem da atividade metabólica dos isolados ambientais 5.1, 21.1 e 21.2 de <i>C. neoformans</i> no modo biofilme, biofilme em formação e células planctônicas determinadas pelo ensaio de redução do sal de XTT para manutenção.....	81
Figura 24. Porcentagem da atividade metabólica das amostras EAF e ATCC 90112 de <i>C. neoformans</i> no modo biofilme, biofilme em formação e células planctônicas determinadas pelo ensaio de redução do sal de XTT para manutenção.....	82
Figura 25. Porcentagem da atividade metabólica das amostras CER (cérebro) e ATCC 56990 de <i>C. gattii</i> no modo biofilme, biofilme em formação e células planctônicas determinadas pelo ensaio de redução do sal de XTT para manutenção.....	83
Figura 26. Porcentagem de sobrevivência dos isolados ambientais 5.1, 21.1 e 21.2 de <i>C. neoformans</i> no modo biofilme, biofilme em formação e células planctônicas determinadas pelo ensaio de redução do sal de XTT para AMB.....	85
Figura 27. Porcentagem de sobrevivência das amostras EAF e ATCC 90112 de <i>C. neoformans</i> no modo biofilme, biofilme em formação e células planctônicas determinadas pelo ensaio de redução do sal de XTT para AMB.....	86
Figura 28. Porcentagem de sobrevivência das amostras CER (cérebro) e ATCC 56990 de <i>C. gattii</i> no modo biofilme, biofilme em formação e células planctônicas determinadas pelo ensaio de redução do sal de XTT para AMB.....	87
Figura 29. Porcentagem de sobrevivência dos isolados ambientais 5.1, 21.1 e 21.2 de <i>C. neoformans</i> no modo biofilme, biofilme em formação e células planctônicas determinadas pelo ensaio de redução do sal de XTT para manutenção.....	89
Figura 30. Porcentagem de sobrevivência das amostras EAF e ATCC 90112 de <i>C. neoformans</i> no modo biofilme, biofilme em formação e células planctônicas determinadas pelo ensaio de redução do sal de XTT para manutenção.....	90
Figura 31. Porcentagem de sobrevivência das amostras CER (cérebro) e ATCC 56990 de <i>C. gattii</i> no modo biofilme, biofilme em formação e células planctônicas determinadas pelo ensaio de redução do sal de XTT para manutenção.....	91
Figura 32. Curva de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> infectadas com distintas concentrações de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> e incubadas a 37°C.....	93
Figura 33. Porcentagem de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> infectadas com biofilmes e células planctônicas de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	94
Figura 34. Expressão do gene lacase (<i>LAC1</i>) normatizada por <i>GAPDH</i> para biofilme e células planctônicas de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	95

Figura 35. Expressão do gene urease (<i>UREI</i>) normatizada por <i>GAPDH</i> para biofilme e células planctônicas de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	96
Figura 36. Expressão do gene de síntese de cápsula (<i>CAP59</i>) normatizada por <i>GAPDH</i> para biofilme e células planctônicas de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	97

Lista de abreviatura

(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amônia
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
AMB	Anfotericina
APC	<i>Antigen presenting cells</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHE	Barreira Hemato-encefálica
CAAF	Concanavalina A + Alexa fluor 488
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standard Institute</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo(s) trifosfato(s)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etileno Diamianino Tetracético
g	Grama
GXM	Glucuronoxilomanana
GXM Gal	Glucuronoxilomanogalactana
h	Horas
HAART	<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IFI	Infecção Fúngica Invasiva
IRIS	<i>Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome</i>
KCl	Cloreto de Potássio
L	Litro

L-Dopa	L-3,4-dihidroxifenilalanina
M	Molar
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MPs	Manoproteínas
NaCl	Cloreto de Sódio
nm	Nanômetro
PBS	Tampão fosfato-salina
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pmol	Picomol
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
TBE	Tris base-ácido bórico
TBS	Tampão Tris-salina
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
Tris	2-amino-2-hidroximetilpropano
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
UV	Ultravioleta
UFC	Unidade formadora de colônia
VCE	Valor de Corte Epidemiológico
vs	Versus
XTT	2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5 - [carbonilo (fenilamino)]-2H-tetrazólio-hidróxido
YEPD	<i>Yeast extract peptone dextrose</i>
α	Alfa

Capítulo I

1. Introdução

1.1. Infecções fúngicas invasivas

As infecções fúngicas invasivas (IFIs) tem apresentado uma diminuição em relação à incidência nas últimas décadas, uma vez que o prognóstico de pacientes tem melhorado devido aos avanços diagnósticos e terapêuticos, incluindo novos antifúngicos (PERFECT, 2013). Mesmo assim, as taxas de morbidade e mortalidade continuam elevadas, o que pode ser explicado pelo número crescente de pacientes em risco (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012; MARTÍN-PEÑA, AGUILAR-GUISADO e CISNEROS, 2013).

A incidência de IFIs é maior em pacientes com leucemia mieloblástica aguda, pacientes com transplantes de células hematopoiéticas e de órgãos sólidos (MARTÍN-PEÑA, AGUILAR-GUISADO e CISNEROS, 2013), pacientes neutropênicos e que recebem terapia com inibidor de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (ORDONEZ, FARRAYE e DI PALMA, 2013) ou ainda pacientes com o vírus HIV (PERFECT, 2012). A incidência das IFIs elevou os custos com os serviços de saúde, especialmente nas unidades de terapia intensiva (UTI) (ZARAGOZA e PEMÁN, 2012).

Muitos estudos realizados em diferentes partes do mundo, mostram a prevalência de *Candida* spp., *Aspergillus* spp. e *Cryptococcus* spp. como principais agentes em IFI (NEOFYTOS *et al.*, 2010; KRIENGKAUYKIAT, ITO e DADWAL, 2011; PRATES *et al.*, 2013). Os trabalhos realizados por Tortorano e colaboradores (2012) e McNeil e colaboradores (2001), identificaram esses agentes como a causa de morte mais comum relacionada a infecções nos EUA e Itália (MCNEIL *et al.*, 2001; TORTORANO *et al.*, 2012). No Brasil, Zicker e colaboradores (2011) avaliaram a epidemiologia de IFI em pacientes transplantados de fígado e observaram que mais de 13% apresentaram infecções fúngicas, sendo as mais comuns causadas por esses três agentes fúngicos (ZICKER *et al.*, 2011).

Outro estudo realizado no Brasil por Colombo e colaboradores (2012), investigou as causas de mortalidade relacionadas às infecções fúngicas no Hospital de São José do Rio Preto (FAMERP) no período de 2000 a 2009. Foi observado que pacientes com infecções fúngicas correspondiam a 1,4% das mortes observadas e que criptococose (45%), seguida por paracoccidiodomicose e candidíase foram as infecções mais encontradas. Quando os autores avaliaram a mortalidade por infecções fúngicas associadas à AIDS, a criptococose permaneceu em destaque com 55% dos casos, seguido de candidíase e histoplasmoses (COLOMBO *et al.*, 2012). Resultados semelhantes foram descritos por Prado e colaboradores em 2009, que em um estudo epidemiológico brasileiro, constataram maior mortalidade por paracoccidiodomicose entre os indivíduos imunocompetentes; porém quando avaliada a

mortalidade associada à AIDS, criptococose apresentou-se como a micose sistêmica mais importante com mais de 50% dos casos, seguido de candidíase e histoplasmose (PRADO *et al.*, 2009).

Diante dos recentes relatos epidemiológicos, a criptococose está entre as três causas de IFI mais importantes, principalmente quando associada aos casos de AIDS (GULLO *et al.*, 2013).

1.2. Criptococose

A criptococose foi descrita pela primeira vez por Abraham Buschke (1867-1922) em 1894, em uma palestra da *Greifswald Medical Society* do Hospital de Cirurgia da cidade alemã de Greifswald sobre uma doença peculiar causada por protozoários, que foi seguido por uma palestra do patologista Otto Busse (1867-1922), sobre uma demonstração de uma espécie coccidia patogênica (KNOKE e SCHWESINGER, 1994). Busse na ocasião denominou-a *Saccharomyces hominis* e a infecção *Saccharomycosis hominis*. Publicações subsequentes do Busse são as primeiras descrições adequadas de criptococose (KNOKE e SCHWESINGER, 1994). No mesmo ano, Sanfelice, na Itália, isolou uma levedura capsulada de suco de pêssogo e no ano seguinte demonstrou sua patogenicidade em animais de laboratório, denominando-a *Saccharomyces neoformans* devido a sua tendência de causar lesões semelhantes a tumores cancerígenos nestes animais (MITCHELL e PERFECT, 1995). Em 1905, Von Hansemann relatou o primeiro caso de meningite criptocócica (MITCHELL e PERFECT, 1995).

A primeira metade do século XX marcou a consolidação de *C. neoformans* como levedura patogênica. *Saccharomyces neoformans*, *Blastomyces neoformans*, *Cryptococcus hominis* e *Torula histolytica* foram alguns dos nomes utilizados para designar a levedura (MITCHELL e PERFECT, 1995). Em 1935, Benham estudando vários isolados recuperados de humanos, agrupou-os dentro do gênero *Cryptococcus* e em 1950, a própria autora propôs a denominação *Cryptococcus neoformans* (BENHAM, 1950; MITCHELL e PERFECT, 1995).

Dentre as micoses sistêmicas e oportunistas, a criptococose se destaca pela sua importância clínica, por estar relacionada a indivíduos aparentemente saudáveis e imunocomprometidos (CHATURVEDI e CHATURVEDI, 2011). O número de casos de criptococose aumentou exponencialmente nos últimos 30 anos, devido ao advento da AIDS, ao uso de terapia imunossupressora em pacientes transplantados e uso de agentes quimioterápicos (MCCLELLAND *et al.*, 2013). Dados recentes mostram que cerca de um milhão de casos de criptococose são relatados anualmente, resultando em 600.000 mortes por

ano, sendo que 1/3 dessas mortes estão associadas a pacientes HIV/AIDS, em algumas áreas, como a África, supera as mortes associadas à tuberculose (PARK *et al.*, 2009; BYRNES *et al.*, 2011; ZHAI *et al.*, 2013).

A infecção por *Cryptococcus* spp. se dá através da inalação das formas infectantes da levedura, os basidiósporos, os quais são encontrados no meio ambiente (MARTINEZ e CASADEVALL, 2006b; CHATURVEDI e CHATURVEDI, 2011; HARRIS *et al.*, 2012; NEGRONI, 2012; STIE e FOX, 2012; ZHU *et al.*, 2012). Em decorrência da infecção, as manifestações, geralmente, ocorrem na forma pulmonar e cerebral (MARTINEZ e CASADEVALL, 2006b; KESSLER, AL KHARRAT e KOURTIS, 2010; CHATURVEDI e CHATURVEDI, 2011; HARRIS *et al.*, 2012; NEGRONI, 2012).

As leveduras colonizam, primeiramente, o tecido alveolar, caracterizando a infecção pulmonar como infecção primária da criptococose, a qual pode se desenvolver em forma aguda, subaguda ou crônica (STIE e FOX, 2012; ZHAI *et al.*, 2013). Nos tecidos pulmonares, a doença pode permanecer em estágio de latência por anos, ou manifestar-se por meio de sinais e sintomas bem variáveis, desde a forma assintomática até pneumonia grave e insuficiência respiratória (BRIZENDINE, BADDLEY e PAPPAS, 2011).

Em indivíduos saudáveis, a infecção é efetivamente combatida pela resposta imunológica pró-inflamatória de células-T, porém em pacientes imunodeprimidos, a levedura difunde-se facilmente por via hematogênica, colonizando vários órgãos, sendo seu principal sítio de infecção, o sistema nervoso central (SNC) (STIE e FOX, 2012). Infecções no SNC correspondem 70% dos casos de criptococose em pacientes com AIDS e essa alta incidência pode ser explicada pelo tropismo que a levedura apresenta pelo SNC e pela capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (KWON-CHUNG, POLACHECK e BENNETT, 1982; ESCANDÓN *et al.*, 2012). No SNC, a levedura pode acometer as meninges e se disseminar através do líquido cefalorraquidiano (LCR) causando meningites, meningoencefalites ou abscessos (criptococomas) (KWON-CHUNG, POLACHECK e BENNETT, 1982).

Outra forma de manifestação da doença é a infecção cutânea, a qual geralmente é secundária à disseminação hematogênica, principalmente em indivíduos com AIDS (MARQUES *et al.*, 2012). Pápulas, placas infiltradas, vesículas herpetiformes, nódulos, edemas, abscessos ou úlceras são observados. Geralmente, as lesões aparecem pedunculadas, em forma de pápulas com seu centro umbilicado e a incidência desta forma de manifestação atinge 15% dos pacientes com infecção sistêmica e 5% dos pacientes com meningite criptocócica (KWON-CHUNG, POLACHECK e BENNETT, 1982).

Um estudo realizado em dois hospitais brasileiros relata que de 11 pacientes com lesões cutâneas, quatro foram diagnosticados com criptococose, mostrando que esta manifestação não é tão rara como descrita em trabalhos anteriores (MARQUES *et al.*, 2012). Podem ainda ocorrer manifestações em outros tecidos, como por exemplo, lesões oculares que causam edema de pupila e atrofia óptica, paralisia do nervo ocular, sendo a cegueira uma seqüela permanente (CHAI e TEOH, 2012), endocardite (ALHAJI e SADIKOT, 2011), infecções nos ossos e articulações (ETTAHAR *et al.*, 2013), próstata (SHAH *et al.*, 2012), comprometimento de gânglios linfáticos (BHUYAN *et al.*, 2013) e acometimento de mucosas como boca e esôfago (KWON-CHUNG, POLACHECK e BENNETT, 1982).

A estratégia terapêutica no tratamento da criptococose apresenta entre 50 e 80% de eficiência (BENNETT *et al.*, 1979; SAAG *et al.*, 1992; VAN DER HORST *et al.*, 1997; DROMER *et al.*, 2007; BRATTON *et al.*, 2013), porém as drogas antifúngicas apresentam toxicidade em aproximadamente um terço dos casos, e a taxa de mortalidade durante o tratamento antifúngico permanece elevada (aproximadamente 20%) (BRATTON *et al.*, 2013).

O tratamento em pacientes imunocompetentes inclui fluconazol ou itraconazol para doença pulmonar leve e a administração intravenosa de anfotericina B (AMB) com ou sem fluorcitosina para as duas primeiras semanas, seguidas por fluconazol ou itraconazol durante mais 10 semanas. O mesmo tratamento é realizado para pacientes imunossuprimidos, porém o tratamento com fluconazol ou itraconazol é continuado durante 6-12 meses por profilaxia. Em infecções do sistema nervoso central, o tratamento consiste em AMB intravenosa com fluorcitosina para as primeiras duas semanas, seguidas por fluconazol para as próximas 8 semanas e depois continuar com a profilaxia secundária. A profilaxia secundária consiste de fluconazol, e pode ser continuado até que a terapia anti-retroviral altamente ativa é instituída (LIMPER *et al.*, 2011; BAJWA e KULSHRESTHA, 2013).

AMB é utilizada como dose de ataque no início do tratamento da criptococose ou “padrão ouro” associado ao fluconazol. Apesar de apresentar alta eficiência, são relatados diversos casos de toxicidade, principalmente quadros de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (PERFECT *et al.*, 2010). A forma lipossomal de AMB reduz consideravelmente a toxicidade, porém apresenta alto custo o que torna muitas vezes inviável o seu uso (KASSAMALI *et al.*, 2013). A associação de AMB com a pirimidina, fluorcitosina é uma estratégia de tratamento em alguns países, uma vez que a associação apresenta redução da toxicidade da AMB e impede o desenvolvimento de resistência fúngica à fluorcitosina (PERFECT *et al.*, 2010).

Os triazóis são utilizados no tratamento da criptococose tanto no início da terapia, quanto a longo prazo, em uma terapia de manutenção. Em especial, o fluconazol é a escolha na maioria dos casos, excetuando-se em quadros de resistência fúngica, a qual é comum devido ao longo tempo de tratamento com este fármaco. O fluconazol pode ser substituído pelos azóis de nova geração como voriconazol, ravuconazol e posaconazol ou pelo itraconazol em casos de tratamento de criptococose pulmonar (ILLNAIT-ZARAGOZI *et al.*, 2008; JARVIS *et al.*, 2008).

1.3. Taxonomia

O gênero *Cryptococcus* compreende mais de 70 espécies, porém *C. neoformans* e *C. gattii* são as duas espécies consideradas de maior patogenicidade e importância epidemiológica tanto para os seres humanos quanto para os animais (LI e MODY, 2010; ESCANDÓN *et al.*, 2012). Além disso, há relatos na literatura de infecções causadas pelas espécies *C. laurentii* e *C. albidus* em pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes (LI e MODY, 2010; BANERJEE *et al.*, 2013; CLEVELAND, GELFAND e RAO, 2013; MOLINA-LEYVA *et al.*, 2013). Trabalhos recentes indicam que *C. albidus*, *C. magnus* e *C. laurentii* causam infecções em mamíferos terrestres e marinhos (LESTER *et al.*, 2011; MCLELAND *et al.*, 2012).

A presença da cápsula polissacarídica envolvendo a levedura, apresenta antígenos capsulares através dos quais as duas espécies consideradas patogênicas, foram classificadas em: *C. neoformans* variedade (var.) *grubii* (sorotipo A), *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) e *C. neoformans* sorotipo AD, *C. gattii* sorotipo B e *C. gattii* sorotipo C (KWON-CHUNG, POLACHECK e BENNETT, 1982; ESCANDÓN *et al.*, 2012; ESPINEL-INGROFF, ALLER, *et al.*, 2012).

No entanto, com base na análise molecular, as duas espécies foram então divididas em oito tipos moleculares designados: *C. neoformans* VNI, VNII, VNIII e VNIV, e, *C. gattii* VGI, VGII, VGIII, e VGIV (MEYER *et al.*, 2003; LI e MODY, 2010). O tipo molecular VGII tem sido dividido em subtipos VGIIa, VGIIb e VGIIc, de acordo com as diferenças polimórficas encontradas no tipo molecular VGII; e, diferenças na sensibilidade à antifúngicos como AMB, fluorcitosina e fluconazol entre esses subtipos já foram relatadas (BYRNES *et al.*, 2009; BYRNES *et al.*, 2010; BYRNES *et al.*, 2011; CHOWDHARY *et al.*, 2011; ESPINEL-INGROFF, ALLER, *et al.*, 2012).

1.4. Ecologia e epidemiologia

C. neoformans e *C. gattii* diferenciam-se quanto ao seu nicho ecológico, sendo *C. gattii* comumente encontrado em madeiras em decomposição de diversas árvores, porém apresenta maior incidência em espécies de *Eucalyptus*, descoberta em 1990 por Ellis e Pfeiffer, quando identificaram o primeiro habitat natural da espécie, associando-a com *E. camaldulensis* (ELLIS e PFEIFFER, 1990; PFEIFFER e ELLIS, 1992; NUCCI *et al.*, 2010). Já *C. neoformans*, apesar de isolado de frutas, vegetais, solos e madeiras em decomposição, seu principal nicho ecológico são excretas secas de aves, principalmente pombos da espécie *Columba livia* (LI e MODY, 2010; CHOWDHARY *et al.*, 2012; LEITE *et al.*, 2012).

Leite e colaboradores (2012) avaliaram o isolamento de *Cryptococcus* spp. em poeiras de livros de três bibliotecas em Cuiabá, Mato Grosso e constataram a presença de sete espécies, entre elas *C. gattii* e *C. neoformans*, assim como *C. laurentii* e *C. luteolus*, as quais já foram relatadas como possíveis causadoras de infecções (LEITE *et al.*, 2012). Diante dos relatos de isolamento da levedura a partir de vários substratos, observa-se a grande diversidade de nichos ambientais para *Cryptococcus* spp.

A clássica associação entre *C. neoformans* e deficiência imunológica foi desafiada pela emergência de criptococose em indivíduos imunocompetentes (KRONSTAD *et al.*, 2011). Porém, as infecções por *C. neoformans* ainda afetam, principalmente, indivíduos imunodeficientes, incluindo pacientes com AIDS, transplantados ou outros pacientes que recebem medicamentos imunossupressores e pacientes com neoplasias hematológicas (LI e MODY, 2010; NUCCI *et al.*, 2010). No entanto, a infecção pode ser associada com níveis menos graves de imunossupressão, incluindo a esplenectomia, a glomerulonefrite crescente, cirrose, fascite necrotizante, associação com infecção causada por *Mycobacterium tuberculosis*, e mesmo a gravidez (LI e MODY, 2010).

Com a introdução da terapia antirretroviral ativa (HAART) foi observada uma redução nas taxas de mortalidade e morbidade dos quadros de criptococose, assim como uma reconstituição do sistema imunológico dos pacientes com AIDS. Porém, esta reconstituição induzida do sistema imunológico, pode ser acompanhada de IRIS (*Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome*). Esse fato, geralmente ocorre por um efeito paradoxal, o qual apresenta agravamento ou recorrência da infecção no início da terapia HAART (NUNNARI *et al.*, 2013).

O patógeno *C. neoformans* é o mais incidente em todo mundo, enquanto que *C. gattii* é considerado clinicamente raro, atingindo somente 1% dos casos de criptococose, além de apresentar-se restrito às zonas tropicais e subtropicais durante muitos anos (NUCCI *et al.*, 2010; CHATURVEDI e CHATURVEDI, 2011; ZHU *et al.*, 2012; ZHAI *et al.*, 2013). No

Brasil, *C. neoformans* é predominante em todo território, sendo mais incidente nas regiões sul, sudeste e centro-oeste, enquanto que *C. gattii* é endêmico para os estados do Norte e Nordeste (SANTOS *et al.*, 2008; TRILLES *et al.*, 2008).

Após 1999, notou-se a expansão da espécie *C. gattii* para regiões de clima temperado. Em 2004, um surto em Vancouver, Canadá, marcou a adaptação desta espécie em clima temperado e expandindo-se por todo continente, chegando ao noroeste dos EUA, atingindo indivíduos saudáveis e animais domésticos e selvagens (KIDD *et al.*, 2004; BYRNES *et al.*, 2011). Um estudo multicêntrico realizado em 20 hospitais do Taiwan avaliou 219 isolados clínicos de pacientes com criptococose no período de 1999 a 2010. Foi constatada a maior prevalência de infecção pela espécie *C. neoformans*, tipo molecular VNI (95,5%) e apenas 4,1% dos isolados foram identificados como *C. gattii* tipo molecular VGII. O estudo reporta a avaliação da sensibilidade dos isolados clínicos às drogas AMB, fluconazol, voriconazol e fluorcitosina e todos os isolados permaneceram na faixa de concentração de VCE (valor de corte epidemiológico) (TSENG *et al.*, 2013).

Recentemente, Espinel-Ingroff *et al.* em 2012 sugeriram VCE entre 0,5-1,0mg/L de AMB para *Cryptococcus* spp. Os VCEs podem monitorar o surgimento de cepas com sensibilidade reduzida, pois é baseado nas CIMs de tipos selvagens de *C. neoformans* e *C. gattii* de laboratórios da Europa, Estados Unidos, Brasil, Índia, Canadá e África do Sul (ESPINEL-INGROFF, Aller, *et al.*, 2012; ESPINEL-INGROFF, CHOWDHARY, *et al.*, 2012), enquanto que os *breakpoints* predizem apenas a evolução da terapia clínica; e mesmo assim, o CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*) não fornece *breakpoints* para espécies de *Cryptococcus* (CLSI, 2008).

No Brasil, Martins e colaboradores em 2011 estudaram 63 isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. recuperados a partir do fluido cérebro-espinhal de pacientes com meningite diagnosticada entre 2008-2010, em Teresina estado do Piauí. Foram avaliadas amostras de pacientes HIV positivos e negativos. Foi observado o isolamento de *C. neoformans* (VNI) predominante em pacientes imunocomprometidos e *C. gattii* (VGII) em pacientes HIV negativos. A ocorrência de *C. gattii* VGII em seis crianças aparentemente saudáveis e em sete adolescentes / jovens adultos na região, reafirma a ocorrência endêmica de *C. gattii* (VGII) em pacientes de pouca idade descritos por Santos e colaboradores em 2008 no estado do Pará (SANTOS *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2011).

Um estudo realizado em Uberaba, Minas Gerais, por Andrade-Silva e colaboradores mostrou a redução significativa da sensibilidade de isolados clínicos e ambientais de *C.*

neoformans e *C. gattii*. Os isolados clínicos mostraram resistência à AMB e itraconazol, e os isolados ambientais apresentaram-se como sensíveis dose dependentes para itraconazol, fluconazol e voriconazol quando se tratava da espécie *C. neoformans*, enquanto que para *C. gattii*, 50% dos isolados foram sensíveis dose dependentes para itraconazol e 50% para fluconazol, além de mostrarem baixa sensibilidade à AMB e itraconazol (ANDRADE-SILVA *et al.*, 2013).

Em nosso laboratório, Teodoro e colaboradores isolaram 87 amostras em diferentes nichos ambientais; excretas de aves e morcegos, do Município de Araraquara, e até o momento provas bioquímicas e morfológicas identificaram todas as leveduras como sendo do gênero *Cryptococcus* (TEODORO *et al.*, 2013). Em trabalhos anteriores, Diniz (2009) avaliou 67 amostras ambientais de excretas de pombos no município de Araraquara (SP) e todos os isolados foram identificados como *C. neoformans* var. *grubii*, VNI. Estes dados confirmam a prevalência da espécie *C. neoformans* e do tipo molecular VNI, em amostras ambientais coletadas de locais públicos em nossa região. Em outro estudo, Matsumoto *et al.*, 2007 identificaram 47 isolados como *C. neoformans* var. *grubii*, sendo 45 do tipo molecular VNI e apenas dois como VNII, todos de pacientes HIV positivos de nossa região, especificamente, das cidades de São José do Rio Preto, Santos, Araraquara e Ribeirão Preto (MATSUMOTO *et al.*, 2007). Almeida e colaboradores também analisaram 83 isolados criptocócicos de várias regiões do Estado de São Paulo e em 78 recuperados a partir de 37 pacientes foram identificados como *C. neoformans* var. *neoformans*. Quatro isolados sequenciais de um paciente foram identificados como sendo *C. gattii* (ALMEIDA *et al.*, 2007).

1.5. Virulência

A cápsula polissacarídica está entre os principais fatores de virulência que as leveduras *C. neoformans* e *C. gattii* apresentam. Esta cápsula protege as células dos processos fagocíticos, sendo crucial para o desenvolvimento da doença, com potentes propriedades imunomoduladoras (VECCHIARELLI e MONARI, 2012). É definida como um complexo superficial de redes compostos por glucuronoxilomanana (GXM), glucuronoxilomanogalactana (GXM Gal) e manoproteínas (MPs) e cada componente apresenta uma ação imunológica.

A GXM atua como um importante modulador imunológico, podendo afetar diretamente múltiplas funções das células do sistema imunológico inato, pois a GXM se liga a receptores de imunoinibitórios de células fagocíticas, que conduz à supressão de atividades biológicas

específicas, incluindo a regulação da atividade de monócitos/macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Os monócitos/macrófagos estão envolvidos na captura e internalização de GXM, e o acúmulo deste no interior das células produz efeitos múltiplos, como a redução da função APC, inibindo diretamente a proliferação de células T (RETINI *et al.*, 1998; VECCHIARELLI e MONARI, 2012), podendo induzir apoptose de células fagocíticas através de interação direta e, também pode levar a apoptose linfócitos T ativados (MONARI *et al.*, 2008; VECCHIARELLI *et al.*, 2013)

Da mesma forma que GXM, GXM Gal é dotada de propriedades imunossupressoras, embora elas diferem-se em vários aspectos. Em particular, doses muito baixas de GXM Gal são suficientes bloquear a proliferação de macrófagos (VILLENNA *et al.*, 2008; VECCHIARELLI e MONARI, 2012) evidenciando que, em comparação com GXM, GXM Gal é muito mais potente na indução de efeitos supressores. Além disso, diferindo de GXM, que afeta a função das células T via APCs, GXM Gal é capaz de se ligar diretamente a células T, produzindo um efeito inibitório direto (MOYRAND, FONTAINE e JANBON, 2007; VECCHIARELLI e MONARI, 2012)

MPs são imunogênicas e induzem a acumulação de TNF α e outras citocinas, IL-12, IL-6, IL-10, IFN- γ e IL-8 em monócitos (PIETRELLA *et al.*, 2004; 2005; 2010; 2011; RODRIGUES e NIMRICHTER, 2012; VECCHIARELLI e MONARI, 2012). Dessa forma, o polissacarídeo capsular contribui para a virulência através de múltiplos efeitos deletérios sobre a resposta imunológica, que por sua vez facilita a propagação de fungos nos tecidos podendo levar o hospedeiro a morte (LEVITZ e SPECHT, 2006; VECCHIARELLI e MONARI, 2012).

Outros fatores de virulência descritos são a deposição de melanina na parede celular, a qual está diretamente relacionada com a patogenicidade da levedura e confere proteção contra fagocitose e morte oxidativa por macrófagos. A melanina é formada a partir de catecolaminas como L-Dopa, dopamina, adrenalina e noradrenalina do SNC do hospedeiro, e por consequência, a presença destas é um dos prováveis mecanismos responsáveis pelo neurotropismo da levedura (NOSANCHUK e CASADEVALL, 2003; BRYAN *et al.*, 2010), e pode ainda estar relacionada no desenvolvimento de resistência a alguns agentes antimicrobianos como, por exemplo, AMB e caspofungina (NOSANCHUK e CASADEVALL, 2003; BRYAN *et al.*, 2010; GULLO, F., 2013).

Além disso, há outros fatores como: o crescimento a 37°C, sendo termotolerantes a temperatura corpórea dos mamíferos; e enzimas extracelulares, como as lacases, que estão associadas a parede do fungo e mediam a formação de melanina, a fosfolipase B, que entre outras funções, regula a integridade da parede celular e contribui para invasão do fungo no

hospedeiro, e a urease, que catalisa a hidrólise de uréia para amônia e carbamato facilitando a invasão do fungo no sistema nervoso central (KRONSTAD *et al.*, 2011).

Chaturvedi e colaboradores sugerem que a presença de manitol pode proteger *C. neoformans* da morte oxidativa por fagócitos, por eliminação de radicais livres de hidroxila. A presença de unidades terminais de ácido siálicos principalmente ligados à galactose em células de *C. neoformans* pode proteger a levedura contra a endocitose, bloqueando sua interação galactose-receptores de macrófagos no hospedeiro, promovendo a repulsão célula-célula (CHATURVEDI *et al.*, 2013).

Alguns estudos reportam *Cryptococcus* spp. como um patógeno intracelular facultativo, o que está associado a patogenicidade, uma vez que a levedura é capaz de replicar no interior de macrófagos, muitas vezes destruindo-o ou fazendo-os de disseminadores para outros tecidos, inclusive a barreira hematoencefálica (BHE) (FELDMESSER *et al.*, 2000; STIE e FOX, 2012).

A capacidade do gênero *Cryptococcus* em formar biofilmes pode ser considerada um fator de virulência, uma vez que genes reguladores dessa formação são cruciais na patogênese e adaptação da levedura no tecido hospedeiro (MARTINEZ e CASADEVALL, 2005; ROBERTSON e CASADEVALL, 2009; ALBUQUERQUE e CASADEVALL, 2012). *Quorum sensing* é o principal mecanismo de comunicação microbiana entre as células no interior do biofilme. Esse processo ocorre através da liberação e monitoramento de auto-indolores. O aumento dessas moléculas é proporcional ao aumento da população fúngica, chegando atingir um limiar crítico que quando atingido, dispara resposta reguladora de genes alvos responsáveis pelo controle da comunidade fúngica, assim como, realizam a coordenação de fatores de virulência durante o processo de infecção ao hospedeiro. A virulência relacionada ao *quorum sensing* para biofilmes de *Candida* spp. está associada ao aumento da sobrevivência da levedura decorrente da maior evasão das leveduras ao sistema imunológico, modulando a resposta imunológica do hospedeiro (HAN, CANNON e VILLAS-Bôas, 2011; ALBUQUERQUE e CASADEVALL, 2012).

1.6. Biofilmes

Biofilmes são definidos como uma comunidade sésil e organizada de células, aderidas a um substrato, podendo estar associados a superfícies bióticas ou abióticas. A comunidade celular está envolvida por matriz extracelular, a qual é autoproduzida e apresentam um fenótipo alterado no que diz respeito à taxa de crescimento e transcrição genética (PIRES *et al.*, 2011;

SARDI *et al.*, 2013). Além disso, a capacidade de formação de biofilmes por microrganismos é considerada uma forma de resistência à terapia antimicrobiana (GULLO *et al.*, 2013).

A formação dos biofilmes envolve uma sequência de eventos que inclui: fase de adesão à superfície, a qual ocorre por meio de eventos físicos e químicos que permitem as células microbianas aderirem fortemente aos substratos; fase de maturação do biofilme que envolve mecanismos de interação dos microrganismos e produção de matriz extracelular; fase de consolidação do biofilme ou clímax, a qual corresponde ao estágio de equilíbrio dinâmico, ou seja, os microrganismos no interior dos biofilmes permanecem em constantes adaptações às alterações ambientais; e por fim, a fase de dispersão que está associada ao aumento do número de células no interior do biofilme e com isso ocorre liberação dessas células para a colonização de outros substratos (CHANDRA *et al.*, 2001; VECCHIARELLI e MONARI, 2012; SARDI *et al.*, 2013).

O desenvolvimento do biofilme proporciona importantes benefícios para os microrganismos, tais como: aumento da concentração de nutrientes nas interfaces líquido-biofilme (matriz polimérica favorece a adsorção de moléculas de nutrientes), proteção contra agressões ambientais (permite a sobrevivência dos microrganismos em ambientes hostis, como: alterações de pH, concentrações de sais, desidratação, substâncias químicas agressivas, bactericidas, antibióticos, predadores, bactérias líticas e metais pesados), troca de material genético (devido aos longos tempos de retenção dos microrganismos), provoca o desenvolvimento de simbiose, utilização de substratos de difícil degradação e capacidade de estabelecer e colonizar nichos ecológicos (MITTELMAN, 1998; SARDI *et al.*, 2013). Sendo assim, os microrganismos que crescem em biofilmes, diferem profundamente das células planctônicas, porém mantém a capacidade invasiva e de evasão do sistema imunológico do hospedeiro (COSTERTON *et al.*, 1995; SARDI *et al.*, 2013).

A formação de biofilmes está associada à utilização de implantes médicos invasivos usados no tratamento de doença ou lesão, e estes incluem polímeros, metais, cerâmicas, compósitos e materiais derivados do tecido (CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2012). Entre estes, os polímeros tem sido amplamente utilizados nos cuidados de saúde, tais como cateteres intravenosos, dispositivos cardiovasculares, dispositivos de acesso da diálise, próteses e implantes ortopédicos, *stents*, dispositivos ventriculares, sistemas poliméricos de distribuição de drogas, entre outros (MARTINEZ e FRIES, 2010). Estes materiais proporcionam um ambiente ideal para a formação de biofilme fúngico, e têm sido associados à infecção com

elevados níveis de resistência antifúngica, bem como estar associada à significativa mortalidade (DE AGUIAR CORDEIRO *et al.*, 2012; 2013).

Walsh e colaboradores (1986) apresentaram o primeiro relato de biofilme de *Cryptococcus*. Um homem de 28 anos apresentou hidrocefalia decorrente de uma infecção por *C. neoformans* envolvendo sua derivação ventrículo-atrial. Estudos ultraestruturais e quantitativos de segmentos do *shunt* demonstraram a presença da levedura *C. neoformans* (WALSH *et al.*, 1986). A partir desse relato, em que *C. neoformans* demonstrou-se capaz de colonizar e, posteriormente, formar biofilmes em derivações ventriculares, fístulas de diálise peritoneal e válvulas cardíacas, tem-se dado maior importância a necessidade de se investigar as propriedades desta levedura para a formação de biofilmes (WALSH *et al.*, 1986; BRAUN *et al.*, 1994; BACH, TALLY e GODOFSKY, 1997; BANERJEE, GUPTA e VENUGOPAL, 1997). Pelo fato de *C. neoformans* apresentar-se como um fungo ambiental, não é surpreendente a sua capacidade de formação de biofilmes, pois seria uma estratégia de sobrevivência da levedura às condições adversas do meio ambiente (GULLO *et al.*, 2013).

Martinez e Casadevall em 2005 definiram as condições para o crescimento do biofilme de *C. neoformans* e as fases de sua formação. Os resultados indicaram que a produção de polissacarídeo capsular e a ligação ao suporte são passos fundamentais para a formação do biofilme desse fungo oportunista. Neste mesmo trabalho, os autores constataram que a formação do biofilme está diretamente relacionada à cápsula polissacarídica, em especial o polissacarídeo capsular GXM, uma vez que a ação de anticorpos anti-GXM inibiu consideravelmente a formação do biofilme criptocócico (MARTINEZ e CASADEVALL, 2005).

O processo exato pelo qual organismos associados a biofilme podem provocar doença no hospedeiro humano ainda é mal compreendido. Alguns mecanismos sugeridos relatam que células fagocíticas têm dificuldade em ingerir os microrganismos em um biofilme, devido às propriedades antifagocíticas da matriz do biofilme (HABASH e REID, 1999; WILSON, 2001).

A matriz do biofilme também é capaz de inibir a quimiotaxia e degranulação de polimorfonucleares e macrófagos, sendo também capaz de deprimir a resposta linfoproliferativa de monócitos (MAH e O'TOOLE, 2001). Estudos têm demonstrado resposta inata e adaptativa a biofilmes, principalmente de bactérias. No entanto, estas infecções são muitas vezes persistentes (ou crônicas), e levam ativação simultânea de ambos os ramos da resposta imune do hospedeiro, nenhum dos quais podem eliminar o patógeno na forma de biofilme, mas em vez disso, em sinergia, provoca dano tecidual colateral (JENSEN *et al.*, 2010).

A natureza da estrutura do biofilme e as características das células que o constituem conferem uma resistência aos agentes antimicrobianos. Os mecanismos moleculares da resistência fúngica do biofilme ainda não estão bem elucidados, porém a resistência aos antifúngicos pode estar relacionada a diversos mecanismos, como às limitações de difusão à passagem do agente pela matriz extracelular, a qual é considerada uma barreira física; alterações fenotípicas das células no biofilme, como por exemplo, alteração no crescimento celular e modulação da atividade metabólica celular, ativação da resposta celular ao estresse, bem como alterações do genótipo das células (GULLO, F., 2013; RAMAGE e WILLIAMS, 2013).

Biofilmes de *C. neoformans* são significativamente mais resistentes a AMB e caspofungina que as células planctônicas (MARTINEZ e CASADEVALL, 2006b; DE AGUIAR CORDEIRO *et al.*, 2013). No entanto, a exposição das células de *C. neoformans* ao fluconazol ou voriconazol não inibe o crescimento dessas leveduras no modo biofilme, e a exposição de biofilmes criptocócicos pré-formados para as mesmas drogas não afetou as atividades metabólicas desses biofilmes (MARTINEZ e CASADEVALL, 2006).

A resistência dos biofilmes de *C. neoformans* aos antifúngicos atualmente utilizados, aliada a outros fatores como a incidência de acometimento do patógeno, a condição econômica da população e a diminuição na disponibilidade de moléculas sintéticas fungicidas reforça o interesse em tratamentos alternativos (MARTINEZ e CASADEVALL, 2006b; DE AGUIAR CORDEIRO *et al.*, 2013; GULLO, F., 2013). Entre as alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções por *Cryptococcus* spp., os ativos derivados de produtos naturais tornam-se substancialmente importantes na viabilização de estudos e experimentos que colaborem no combate a tais microrganismos (GULLO *et al.*, 2013).

1.7. Estratégias terapêuticas contra *Cryptococcus* spp.

Muitos estudos relatam novas alternativas terapêuticas para o tratamento da criptococose, assim como para o combate da formação de biofilmes. Entre essas terapias estão o uso de produtos naturais e seus derivados (TOCCI *et al.*, 2011; GULLO *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2012); a combinação entre novas substâncias antifúngicas e os fármacos usados na terapêutica convencional, relatando um efeito sinérgico (HAN e LEE, 2005; SERENA *et al.*, 2005; DA SILVA *et al.*, 2012); o uso dos fármacos usuais associados à nanopartículas (YAGUCHI *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2011); a terapia fotodinâmica (FUCHS *et al.*, 2007; SOARES *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2012); imunoterapia com o uso de

anticorpos monoclonais (ANTACHOPOULOS e WALSH, 2012; HARDISON *et al.*, 2012) e a radioimunoterapia (JIANG *et al.*, 2012).

Entre os tratamentos alternativos contra *Cryptococcus* spp., o uso de produtos naturais e seus derivados são considerados uma ótima opção, uma vez que o Brasil é o país com a maior diversidade vegetal do mundo e conta com mais de 55.000 espécies vegetais catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (SIMÕES *et al.*, 2010). Assim, desde 1998 vem sendo realizada no Instituto de Botânica de São Paulo uma triagem de espécies nativas da Mata Atlântica e do Cerrado com metabólitos responsáveis por atividades antifúngicas, antibacteriana, antitumoral e antioxidante. As espécies que mostram algumas dessas atividades são selecionadas para estudos fitoquímicos visando à identificação dos princípios ativos (MOTANARI e BOLZANI, 2001).

Dados sobre a atividade antimicrobiana de extratos vegetais, avaliada frente a microrganismos sensíveis e resistentes, bem como o possível efeito sinérgico da associação entre antibióticos e extratos vegetais, são relevantes, permitindo concluir que estudos mais detalhados sobre o uso terapêutico das plantas devem ser intensificados (GULLO *et al.*, 2012).

Apesar do extenso número de trabalhos que relatam a atividade antifúngica de substâncias naturais contra isolados sensíveis e resistentes de *Cryptococcus* spp., ainda são escassos os relatos da atividade dessas substâncias contra a levedura na formação de biofilme e na consolidação do mesmo (RIVAS DA SILVA *et al.*, 2012).

Rogers e colaboradores em 2010 verificaram que as amidas 2-aminoimidazol/triazol têm atividade anti-biofilme formado de várias espécies de bactérias e de leveduras, incluso *Cryptococcus*. Da Silva e colaboradores, em 2010 descreveram a ação de aldiminas, compostos derivados de aldeído que contêm um grupo $C = N$. Aldiminas arilo 2 - (benzylideneamino) fenol (3) e 4 - (benzylideneamino) fenol (8) foram os compostos mais ativos contra os fungos estudados, incluindo que os compostos 3 e 8 eficientemente inibiram o metabolismo de biofilme maduro de *C. neoformans* (DA SILVA *et al.*, 2012).

Em nosso laboratório, Pires e colaboradores em 2011, investigaram a atividade anti-*Candida* de 16 óleos essenciais sobre culturas planctônicas e de biofilme do complexo de *C. parapsilosis*. Entre os óleos essenciais, o óleo de canela foi o que mostrou a maior atividade, sendo que contra células planctônicas de *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis* apresentou valor de CIM 250 e 500 µg/mL, respectivamente. Porém em biofilmes consolidados de *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis*, o óleo essencial de canela mostrou um aumento da CIM em quatro vezes, 1000 e 2000 µg/mL, respectivamente. Já a atividade do óleo de canela durante a formação do

biofilme mostrou inibição da formação do mesmo em concentrações acima de 250 µg/mL para ambas as espécies testadas (PIRES *et al.*, 2011). Em 2012, os mesmos autores estudaram a atividade do ácido úsnico contra *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis* em condições planctônicas e biofilme. Foi verificada a redução da atividade metabólica das células sésseis do complexo de *C. parapsilosis* em 80% em concentração quatro vezes maiores que a concentração inibitória de células planctônicas (PIRES, LUCARINI e MENDES-GIANNINI, 2012).

Théraud e colaboradores (2004) avaliaram a eficácia de cinco diferentes desinfetantes de superfície e três diferentes radiações UV contra isolados clínicos em culturas puras e mistas de *C. albicans*, *C. neoformans* e *Rhodotorula rubra* e contra isolados ambientais de *C. albicans* e *C. uniguttulatus*, ambos isolados foram avaliados em condição planctônica e biofilme. Entre todas as combinações testadas, observou-se menor sensibilidade dos isolados quando dispostos em forma de biofilmes e somente clorexidina e peróxido de hidrogênio, em altas concentrações, foram ativos contra os biofilmes (THÉRAUD *et al.*, 2004).

Diante da escassez de substâncias ativas em biofilmes de *Cryptococcus* spp. provenientes de isolados clínicos e ambientais, a busca por novos agentes antifúngicos são necessários. No Brasil, o uso de plantas medicinais na medicina tradicional tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. A ampla distribuição dos recursos naturais em ecossistemas brasileiros e a diversidade natural de componentes químicos proporcionam ao país potenciais materiais bioativos (DUARTE *et al.*, 2005; GULLO *et al.*, 2012; GULLO, F. P., 2013).

M. ilicifolia é conhecida popularmente como "espinheira-santa", "cancerosa", "cancorosa-de-sete-espinhos" e "maiteno", dentre outros nomes (Lorenzi e Matos, 2008). Pertence à família Celastraceae possuindo 55 gêneros e 850 espécies espalhadas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (SANTOS-OLIVEIRA, COULAUD-CUNHA e COLAÇO, 2009).

Metabólitos secundários de *M. ilicifolia* isolados principalmente a partir da casca das raízes da planta têm mostrado atividade antimicrobiana contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos e antifúngica contra isolados sensíveis e resistentes de *C. neoformans* e *C. gattii*, assim como para outros fungos patogênicos como *Candida* spp., *Trichophyton* spp., *Aspergillus* spp., *Histoplasma* spp. e *Paracoccidioides brasiliensis* (DE LEÓN, LÓPEZ e MOUJIR, 2010; DOS SANTOS *et al.*, 2010; GULLO *et al.*, 2012). Outras atividades também já foram descritas para *M. ilicifolia*, como: antiprotozoária (DOS SANTOS *et al.*, 2013), antioxidante (DOS SANTOS *et al.*, 2010), antiviral (KOHN *et al.*, 2012), dentre outros.

Assim, o presente estudo entre os seus vários objetivos, avalia o potencial antifúngico contra biofilmes da substância pura maitenina, extraída da planta *Maytenus ilicifolia*, a qual foi previamente avaliada em nosso laboratório quanto a sua atividade frente aos isolados sensíveis e resistentes de *C. neoformans* e *C. gattii*, assim como para outros fungos patogênicos (GULLO *et al.*, 2012).

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Determinar a capacidade de isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, de diferentes fontes formarem biofilmes, e avaliar o efeito de anfotericina B e maitenina sobre as células planctônicas e na prevenção da formação desses biofilmes, bem como sobre os biofilmes formados. Por outro lado, analisar a virulência das espécies de *Cryptococcus* utilizando o modelo *Galleria mellonella* em células planctônicas e células que passaram por formação de biofilme e ainda avaliar diferenças na expressão gênica de *C. neoformans* e *C. gattii* no modo biofilme e no modo planctônico.

2.2. Objetivos específicos

- Comparar isolados advindos de fontes ambientais a partir de excretas de pombos da cidade de Araraquara, bem como de pássaros, quanto à capacidade de formar biofilmes e caracterizar a formação de biofilme de *Cryptococcus* spp. por diferentes metodologias;
- Verificar a sensibilidade de biofilmes de *Cryptococcus* frente ao fármaco antifúngico sintético, anfotericina B;
- Verificar a sensibilidade de biofilmes de *Cryptococcus* frente ao fármaco antifúngico natural, maitenina;
- Determinar e comparar a sensibilidade de maitenina sobre biofilmes de *Cryptococcus* spp. no formato biofilme e de células planctônicas criptocócicas;
- Analisar a virulência das espécies de *Cryptococcus* utilizando o modelo *Galleria mellonella* em células planctônicas e células que passaram por formação de biofilme;
- Avaliar diferenças na expressão gênica de *Cryptococcus* spp. no modo biofilme e planctônico.

3. Material e Métodos

3.1. Microrganismos

A capacidade de formar biofilme foi avaliada em 19 isolados de *Cryptococcus* spp., de fontes ambientais, selecionados aleatoriamente de 43 isolados de excretas de pombos da cidade de Araraquara, em projeto realizado em colaboração com a Secretaria de Vigilância Sanitária do Município. As cepas *C. neoformans* ATCC 90112 e *C. gattii* ATCC 56990 foram obtidas do laboratório da disciplina de Micologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP Campus Araraquara-SP. O isolado clínico EAF foi recuperado de líquido de paciente morto por meningite criptocócica na cidade de Araraquara e gentilmente cedido pelo Instituto Adolfo Lutz de São Paulo. Os isolados 118 e CER (cérebro) foram recuperados no laboratório da disciplina de Micologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP Campus Araraquara-SP a partir de um psitacídeo e uma calopsita, respectivamente doados pelo Departamento de Patologia Veterinária UNESP Jaboticabal, após diagnóstico de morte.

3.2. Identificação dos isolados

3.2.1. Extração do DNA genômico das amostras

As culturas para extração de DNA foram realizadas a partir de uma colônia semeada em ágar Sabouraud (*Difco Laboratories, Detroit, MI*) acrescido de 0,25g/L de cloranfenicol a 30°C durante 48h e em seguida em caldo YEPD (*Difco Laboratories, Detroit, MI*) acrescido de 2,9% de NaCl a 30°C por 16h ou overnight sob agitação constante (150rpm). As culturas foram transferidas para tubos de 50mL e a extração foi realizada segundo Moller *et al.*, 1992 (Möller *et al.*, 1992). A quantificação de DNA foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 260nm e estocada a -20°C. A pureza foi determinada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 260nm e 280nm e analisada por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1X (90mM Tris-base, 90 mM ácido bórico, 2mM EDTA pH 8,0) durante 1 hora e 30 minutos a 80 volts. O gel foi corado com GelRed (*Biotium, Hayward, CA, USA*) e observado em luz ultravioleta.

3.2.2. PCR-RFLP: Gene URA5

Foram utilizados os iniciadores para o gene URA 5: ura5f (5' ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG 3') e ura5r (5'TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC 3') (Meyer *et al.*, 2003). As concentrações foram

de 50pmol de cada sequencia iniciadora e 25ng de DNA genômico num tubo contendo uma mistura de dNTP (0.2mM), tampão (2,0mM MgCl₂, 50mM KCl, 20mM (NH₄)₂SO₄ e 75mM Tris-HCl pH 9,0) e DNA polimerase termoestável (*Biotoools*®). A quantidade final na reação de amplificação foi de 50μL. A amplificação foi realizada através de um ciclo inicial com temperatura de desnaturação de 94°C/3minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C/45segundos, 61°C/1 minuto, 72°C/2minutos e um ciclo final a 72°C/10 minutos, em termociclador GeneAmp 9700 machine (*Perkin Elmer Corporation, Foster City, USA*). O produto amplificado foi digerido com enzima de restrição Cfr13 e HhaI por 3h e os produtos separados por eletroforese em gel de agarose a 3% em tampão TBE 1x durante 5h e 30 minutos a 100 volts. O gel foi corado com GelRed e observados à luz ultravioleta.

3.3. Formação do biofilme

A formação de biofilme foi adaptada do trabalho de Martinez e Casadevall, 2005. Foram feitas adaptações que redundaram em formação de biofilme mais consistente com as descrições da literatura. Os isolados de *Cryptococcus* foram cultivados em caldo Sabouraud dextrose (*Difco Laboratories, Detroit, MI*) por 24h a 30°C num agitador rotativo a 150rpm (para início da fase estacionária). As células foram coletadas por centrifugação lavadas duas vezes com tampão fosfato (PBS) e suspensas a 10⁸ células/mL no mesmo tampão. Para cada linhagem, 100μL da suspensão foram adicionados nos poços das placas de poliestireno de 96 poços (TPP®, *Trasadingen, Switzerland*). As placas foram incubadas a 37°C por cinco horas. O tampão foi então retirado e adicionado a cada poço 200μL de meio RPMI 1640 com glutamina e sem bicarbonato de sódio acrescido de 10% de soro fetal bovino. Os biofilmes foram incubados em agitador a 70rpm por 72h. Três poços sem células *Cryptococcus* spp. foram utilizados como controle. Após a etapa de adesão, os poços contendo os biofilmes *Cryptococcus* spp. foram lavados três vezes com PBS para remover células não aderidas. Células fúngicas que permaneceram ligadas à superfície de plástico foram consideradas biofilmes verdadeiros. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (Martinez e Casadevall, 2005).

3.4. Caracterização estrutural do biofilme

A formação de biofilme *in vitro* por leveduras de *C. neoformans* e *C. gattii* foram caracterizadas em nível estrutural utilizando microscopia de fluorescência, microscopia

eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal de varredura a laser. Foram utilizadas para tanto as cepas de *C. neoformans* ATCC 90112 e de *C. gattii* ATCC 56990.

3.4.1. Microscopia de Fluorescência

Para a microscopia de fluorescência, biofilmes maduros foram formados conforme descritos no item 3.2 sobre lamínulas de vidro. Os biofilmes foram corados com o reagente Calcofluor White Stain (Fluka®). Nesta etapa, 50µL do corante foram adicionados sobre as lamínulas contidas na placa. Em seguida, as lamínulas foram transferidas para uma lâmina para observação em microscópio de fluorescência. Calcofluor é um fluorocromo não específico que se liga à celulose e quitina na parede celular fúngica. Este procedimento de coloração constitui um método rápido para a detecção de leveduras e fungos patogênicos (Harrington e Hageage, 2003). Um intervalo de 300 a 440nm foi utilizado para emissão e a excitação ocorre, em média, a 355nm.

3.4.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a MEV, o biofilme foi formado sobre lamínulas de vidro e processado conforme descrito por Morris, Monier *et al.* (1997) e modificado por Ells e Truelstrup Hansen (2006) (MORRIS, MONIER e JACQUES, 1997; ELLS e TRUELSTRUP HANSEN, 2006). Inicialmente, as amostras foram lavadas três vezes com tampão TBS para remoção das células planctônicas e fixadas com glutaraldeído 3% e paraformaldeído 2% em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,4 por 18h a 4 °C. A seguir, o biofilme foi lavado com tampão fosfato puro e adicionado tetróxido de ósmio 1% por 16h. Decorrido esse tempo, o material foi lavado novamente com o mesmo tampão e submetido a desidratações crescentes de álcool etílico. As amostras foram secas usando o método do ponto crítico com CO₂ em um dessecador 780 Samdri (Rockville, MD, USA). Em seguida, foram montadas em cilindros de alumínio com prata e colocadas em um evaporador de alto vácuo para o revestimento de ouro por 6 minutos pelo metalizador BalzerSputtering SCD-030 (Balzers Instruments, Balzers, Liechtenstein). Características topográficas dos biofilmes foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss-Leica/440 do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (USP), operado a 25 kV.

3.4.3. Microscopia Confocal de Varredura a Laser

A microscopia confocal foi realizada segundo Martinez e Casadevall, 2005. Biofilmes maduros foram incubados por 45 minutos a 37°C em uma solução de CAAF (Concanavalina A – conjugada à Alexa fluor 488 – *Molecular Probes*) e FUN 1 (*Molecular Probes, USA*). Dessa forma, foram adicionados 4µL de FUN-1 10mM e 15µL de CAAF 488 5mg/mL em 3 mL de PBS estéril, obtendo as seguintes concentrações de 10µg/mL de FUN 1 e 25µg/mL de CAAF. Decorrido esse tempo, as lamínulas foram lavadas com água destilada, retiradas dos poços e invertidas sobre 4µL de Fluoromount-G (*Sigma-Aldrich®*), anteriormente depositado sobre lâminas de microscopia para observação em microscópio confocal (LSM 510 – META, Zeiss®). Estes ensaios foram realizados em colaboração com Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, Departamento de Biologia Celular, sob a coordenação do professor Dr. Marcelo Machado Pelajo.

3.5. Atividade metabólica do biofilme

A atividade metabólica dos biofilmes foi avaliada de acordo com Martinez e Casadevall (MARTINEZ e CASADEVALL, 2006b). Uma medida semiquantitativa da formação de biofilmes de *C. neoformans* e *C. gattii* foi obtida a partir do ensaio de redução do 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil) -5 - [carbonilo(fenilamino)]-2H-tetrazólio-hidróxido (XTT). Para as amostras de biofilme, 50µL de solução de XTT (1mg/mL em PBS) e 4µL de solução de menadiona (1mM em acetona; *Sigma Chemical Co.*) foram adicionados a cada poço. As placas de microtitulação foram incubadas a 37°C por 5h. A atividade metabólica das células do biofilme é medida pela atividade da desidrogenase mitocondrial, que reduz o sal de XTT tetrazólio para sal de XTT formazan, resultando em uma mudança colorimétrica. A mudança colorimétrica foi medida com um leitor de microplacas (*iMark™ Microplate Reader; BIO-RAD*) a 490nm. Em todos os experimentos, meio RPMI isento da formação de biofilme foi incluído como controle negativo.

3.6. Sensibilidade de biofilmes de *Cryptococcus* spp. as drogas antifúngicas

A sensibilidade dos biofilmes de *Cryptococcus* spp. foi testada para o antifúngico sintético anfotericina B (*Sigma-Aldrich®*) e para a maitenina. A análise da atividade antifúngica foi avaliada na prevenção da formação de biofilmes de *Cryptococcus* spp., bem

como seus efeitos sobre o biofilme maduro. Para cada amostra, a atividade antifúngica dessas duas situações foi comparada com as atividades antifúngicas das suas respectivas células planctônicas, segundo Martinez e Casadevall (MARTINEZ e CASADEVALL, 2006b).

3.6.1. Efeito das drogas antifúngicas na prevenção da formação do biofilme de *Cryptococcus* spp.

Para avaliar os efeitos das drogas antifúngicas na formação do biofilme, células de *C. neoformans* e *C. gattii* foram suspensas a 10^8 células/mL em tampão PBS. Para cada linhagem, 100µL da suspensão foram adicionados nos poços das placas de 96 poços e incubados a 37°C por cinco horas. Logo após, o tampão foi retirado e foram adicionados 200µL de anfotericina (AMB) ou maitenina diluídas em meio RPMI 1641 em concentrações que variaram de 0,0625 a 128mg/L. As placas foram encubadas a 37°C por 48h. Após a incubação, a atividade metabólica do biofilme foi quantificada pelo ensaio de redução do XTT.

3.6.2. Efeito das drogas antifúngicas em biofilmes maduros de *Cryptococcus* spp.

Para avaliar a sensibilidade dos biofilmes maduros de *Cryptococcus* spp., 200µL de meio RPMI 1640 contendo anfotericina B (0,0625-128mg/L) ou Maitenina (0,0625-128mg/L) foram adicionados a cada poço. Biofilmes maduros e drogas antifúngicas foram incubados a 37°C por 48h. Após a incubação, a atividade metabólica do biofilme foi quantificada pelo ensaio de redução do XTT.

3.6.3. Efeito das drogas antifúngicas em células planctônicas de *Cryptococcus* spp.

A sensibilidade das drogas antifúngicas em células planctônicas de *Cryptococcus* spp. foi realizada de acordo com o documento M27-A3 (2008) do CLSI (*Clinical Laboratory Standad Institute*). O meio de cultura utilizado para a realização dos testes de sensibilidade foi RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio e acrescido de 2% de glicose, tamponado com MOPS 0,165M, pH 7,0. A concentração final dos inóculos foi ajustada entre $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. A faixa de concentração de AMB e maitenina foi de 0,0625 a 128mg/L. As placas foram incubadas com agitação de 150rpm por 48h a 37°C. Após a incubação, a atividade metabólica do biofilme foi quantificada pelo ensaio de redução do XTT.

3.7. Ensaio de morte

A toxicidade das drogas antifúngicas para os biofilmes de *Cryptococcus* e células planctônicas foram comparadas pelo ensaio de morte (UFC) de acordo com (Martinez e Casadevall, 2006b). Após a incubação com os antifúngicos testados os biofilmes de *Cryptococcus* foram raspados do fundo dos poços com uma micropipeta de 200µL para dissociação das células. Um volume de 100µL de suspensão contendo células dissociadas foi aspirado dos poços, transferido para um tubo Eppendorf com 900µL de PBS e agitadas por 3 minutos. Então, foram realizadas diluições em série e 100µL de cada suspensão foram semeadas em placas de ágar Sabouraud dextrose. A porcentagem de sobrevivência UFC foi determinada pela comparação da sobrevivência dos biofilmes de *Cryptococcus* spp. dos tratados com os das células fúngicas incubadas em PBS.

3.8. Análise da expressão gênica

3.8.1. Extração de RNA e Síntese de cDNA

O RNA total foi obtido pela adição de TRIZOL[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), conforme descrito por (VOLTAN *et al.*, 2013) depois do crescimento das células de *Cryptococcus* spp. no modo planctônico e da formação do biofilme conforme descrito no item 3.3. O RNA total das duas situações foi tratado com DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), e em seguida, sua integridade foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%. Por fim, o RNA foi quantificado em espectrofotômetro e quantificado. Três amostras independentes de RNA foram preparadas para utilização nos experimentos. As amostras foram armazenadas a -80°C. A síntese da primeira fita de cDNA foi feita em uma reação contendo 1µg de RNA total, 10pmol/µL da sequência iniciadora (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3') e essa mistura foi aquecida por 2 minutos a 72°C. Em seguida foi acrescentado 10pmol/µL do oligo dT modificado (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT(30)N1N, onde N=A, C, G ou T; N1=A, G ou C), 2µL de uma mistura de dNTPs (10mM), 2µL de RNaseOUT (40U/µL) (Invitrogen), 0,4µL de DTT (100mM), 1,2µL de cloreto de magnésio (50mM), 2µL da enzima transcriptase reversa (200U/µL) (*RT Superscript II* - Invitrogen) e 4µL de tampão 5X (250mM Tris-HCl pH 8,3; 375mM KCl; 15mM MgCl₂). Esta reação foi incubada a 42°C durante 1 hora e trinta minutos.

Após este período foi adicionado 80µL de TE (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA pH 8,0) e aquecido por mais 10 minutos a 72°C.

3.8.2. PCR em Tempo Real (*Real Time* PCR)

Para a análise da expressão diferencial de genes por PCR em Tempo Real (*Real Time* PCR), foram utilizados iniciadores específicos para genes codificantes das proteínas diferencialmente expressas em *Cryptococcus* spp. (Tabela 2 – em apêndice B). As reações foram realizadas utilizando-se 20ng/µL de cDNA, 10µL de SYBR green ROX mixture (Applied Biosystems), e 0,8µM de cada primer, sendo adicionado a reação água até atingir o volume de 20µL. As reações foram realizadas com temperatura inicial de 50°C por 2 minutos, seguido por 10 minutos a 95°C. Depois, 40 ciclos de 95°C a 15 segundos, seguidos de anelamento e síntese a 60°C por um minuto. Em seguida da PCR, a análise da curva de melting foi realizada para confirmar a emissão de sinal correspondente a um único produto. As reações foram realizadas em triplicata com o aparelho Applied Biosystems 7500 cyclor e os dados foram analisados pelo método $2^{-\Delta CT}$, onde $\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{alvo}} - \Delta Ct_{\text{endógeno}}$ (Livak e Schmittgen, 2001). Com os valores obtidos para as amostras em triplicata foi calculado a média e então o valor $2^{-\Delta CT}$ (GAPDH foi utilizado como controle endógeno da reação). Os mesmos genes foram testados para amostras de *C. neoformans* e *C. gattii* no modo planctônico e biofilme, nas mesmas condições de temperatura, meio de cultura e tamanho de inóculo.

3.9 Teste de virulência utilizando *Galleria mellonella*

Para o ensaio de sobrevivência foram utilizados os isolados 21.2 e CER e as cepas de *C. neoformans* ATCC 90112 e *C. gattii* ATCC 56990.

3.9.1 Condições de manipulação e incubação de larvas de *Galleria mellonella*

Galleria mellonella em estágio larvário selecionadas com peso entre 0,2 - 0,3g foram separadas em placas de Petri (grupos de 8 larvas) e incubadas a 37°C no escuro na noite anterior aos experimentos. Antes da infecção, foi realizada a assepsia das pró-patas com etanol a 70%. As suspensões de leveduras foram injetadas nas larvas com auxílio de seringas Hamilton (*Hamilton, EUA*) de 10µL. A morte das larvas foi avaliada por inspeção visual da cor (marrom-

escuro) ou por falta de movimento após tocá-las com uma pinça. Para cada condição, um total de 16 larvas foi utilizado e cada experimento foi repetido pelo menos duas vezes.

3.9.2 Ensaio de sobrevivência das larvas após infecção de células planctônicas de *Cryptococcus* spp.

Para as curvas de sobrevivência foram utilizados de 5×10^5 , 10^6 , e 5×10^5 UFC/larva de cada amostra de *Cryptococcus* spp. As suspensões fúngicas foram preparadas em PBS acrescido de 20mg/L de ampicilina para evitar a contaminação bacteriana. As larvas infectadas foram incubadas a 37°C e monitoradas durante 7 dias. Como controle, para ambas as leveduras foram realizadas infecções com células previamente mortas com 4% de paraformaldeído por 1h, garantindo que a morte acontece pela infecção da levedura.

3.9.3 Ensaio de sobrevivência das larvas após infecção de células de *Cryptococcus* spp. raspadas do biofilme

Biofilmes de cada amostra de *Cryptococcus* spp. foram formados conforme descrito no item 3.3. Após a formação do biofilme (72h) as células foram raspadas dos poços da placa de poliestireno com o auxílio de uma ponteira estéril. Para as curvas de sobrevivência foram utilizadas suspensões de 5×10^5 , 10^6 , e 5×10^5 UFC/larva preparadas em PBS acrescido de 20mg/L de ampicilina para evitar a contaminação bacteriana. As larvas infectadas foram incubadas a 37°C e monitoradas durante 7 dias. Como controle foram realizadas infecções com células previamente mortas com 4% de paraformaldeído por 1 h, garantindo que a morte acontece pela infecção da levedura.

3.10 Análise estatística

As curvas de cinética de formação de biofilme foram avaliadas utilizando o programa OriginPro 8.0 (*Origin Lab Corporation, Northampton, MA*). Para obter a associação entre as metodologias utilizadas para capacidade de formação de biofilme de diferentes isolados, um modelo linear geral foi gerado após análise estatística neste mesmo programa. Os testes de sensibilidade de *Cryptococcus* spp. a drogas antifúngicas, ensaio de sobrevivência e a expressão gênica de *LACI*, *UREI* e *CAP59* em biofilmes e células planctônicas de *Cryptococcus* spp. foram avaliadas segundo a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Todos

os dados foram avaliados pelo programa Prism 5.0 (*GraphPad Software, CA, USA*) e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4. Resultados

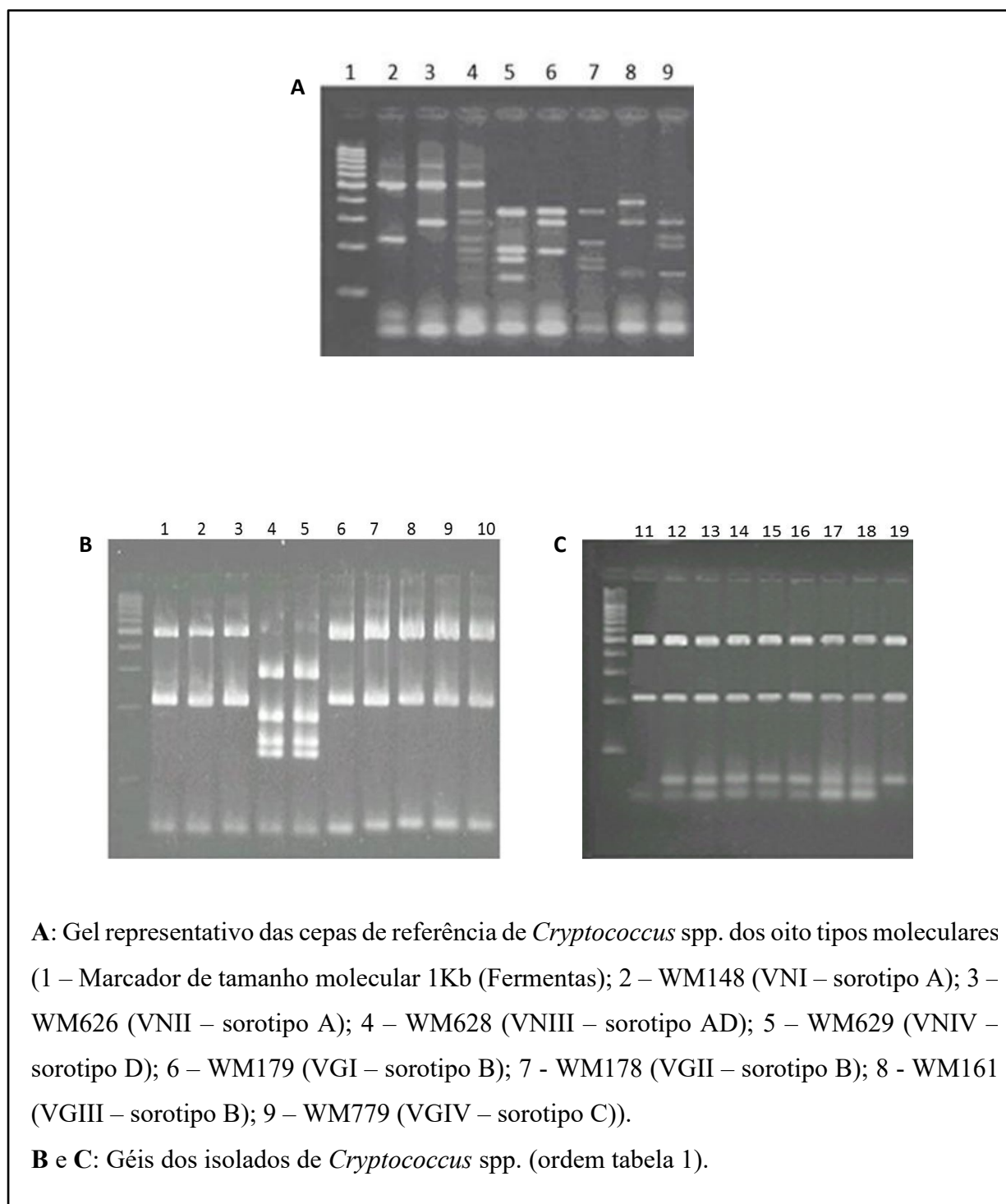
4.1. Seleção das amostras

Os 19 isolados foram identificados em gênero por provas fenotípicas, segundo Kurtzman e Fell (1998) e Kwon-Chung *et al.* (1992) e a diferenciação das espécies *gattii* e *neoformans* foi realizada pelo crescimento seletivo em meio glicina, canavanina e azul de bromotimol (CGB) e por assimilação de D-prolina, segundo Kwon-Chung *et al.* (1982). As amostras ambientais foram obtidas em estudo colaborativo com a Vigilância Sanitária da cidade de Araraquara (Anexo - Tabela 1). Dentre os 19 isolados, os de fontes ambiental e humana foram identificados como *C. neoformans* e os dois isolados de pássaros como *C. gattii*.

4.1.1. Determinação da tipagem molecular por PCR-RFLP

Cepas padrões foram utilizadas para identificar os isolados nos oito tipos moleculares previamente descritos. Os perfis dos isolados foram analisados de acordo com o tamanho dos fragmentos definidos por meio das imagens digitalizadas capturadas dos géis demonstradas na Figura 1 abaixo e descritas na Tabela 1 no apêndice A.

Figura 1. Perfis de PCR-RFLP dos isolados de *Cryptococcus* spp.



4.2 Formação do Biofilme

Inicialmente foi avaliada a capacidade de formação de biofilme *in vitro* das cepas de *C. neoformans* ATCC 90112 e *C. gattii* ATCC 56990. A formação do biofilme pelas cepas de *Cryptococcus* spp foi evidenciada por microscopia de fluorescência, MEV e confocal a laser (CLSM). Foi possível observar que as duas cepas foram capazes de formar aglomerados de células, caracterizados por comunidade de microrganismos aderidos firmemente a uma superfície não biológica, resultando na formação de um biofilme maduro, quando colocados em contato com o meio de cultura RPMI 1621 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2% de glicose em temperatura ótima de 37°C.

4.2.1 Microscopia de Fluorescência

A microscopia de fluorescência do biofilme foi evidenciada pela emissão de fluorescência azul, produzida pelo fluorocromo Calcofluor. As figuras 2 e 3 representam o biofilme formado pelas cepas *C. neoformans* ATCC 90112 e *C. gattii* ATCC 56990, com uma intensa coloração azul, proveniente da ligação do fluorocromo à parede celular do fungo. No entanto, a microscopia de fluorescência não possibilita a visualização do biofilme como uma rede tridimensional. Dessa forma, outras técnicas microscópicas foram utilizadas, para caracterizar o biofilme em nível estrutural.

Figura 2. Imagens de microscopia de fluorescência de biofilmes de *C. neoformans* ATCC 90112.

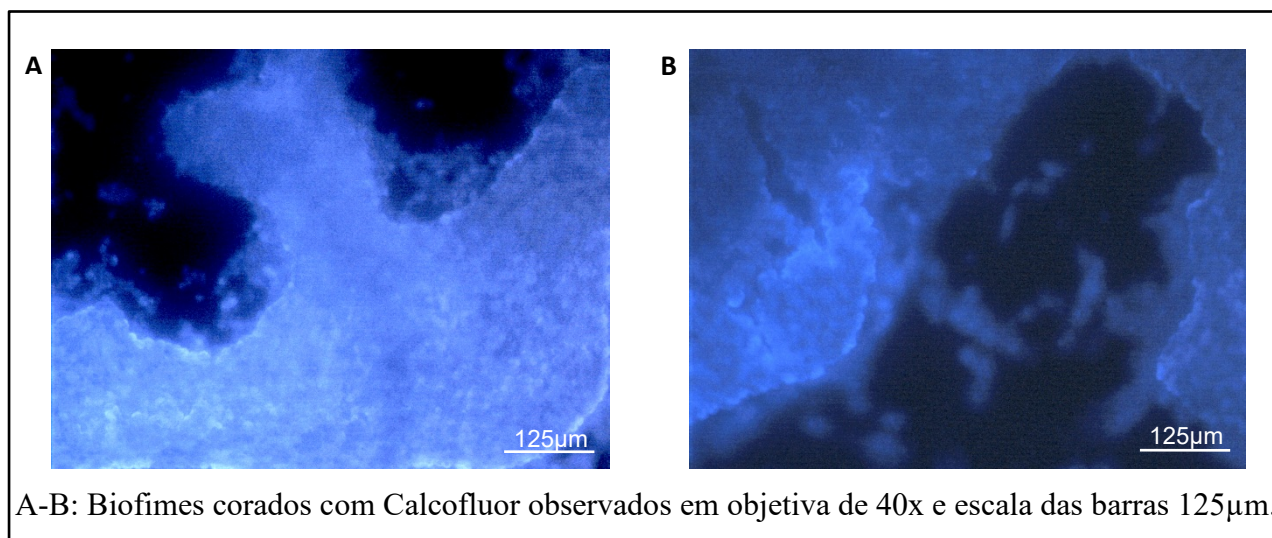
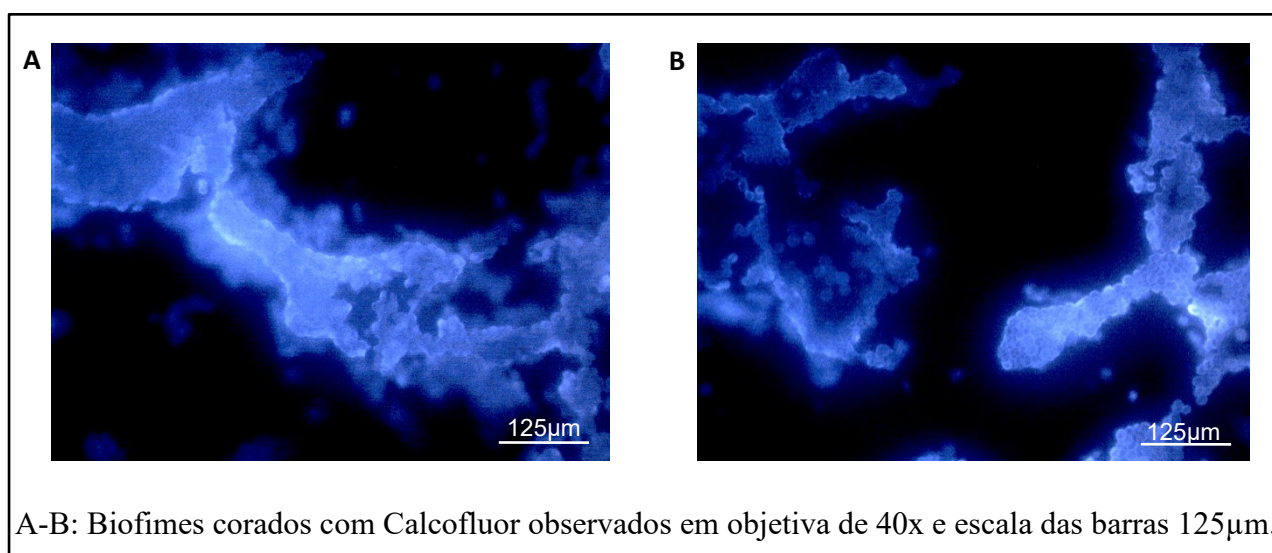


Figura 3. Imagens de microscopia de fluorescência de biofilmes de *C. gattii* ATCC 56990.



4.2.2 MEV

A microscopia eletrônica de varredura forneceu informações úteis sobre a morfologia celular presente na estrutura do biofilme. O biofilme das cepas *C. neoformans* ATCC 90112 e *C. gattii* ATCC 56990 consistiu de uma rede densa de leveduras, mostrado nas figuras 4 (A, B e C) e 5 (A, B e C). Nas figuras 4C e 5C é possível evidenciar matriz extracelular autoproduzida unindo estas células.

Figura 4. Eletromicrografia dos biofilmes de *C. neoformans* ATCC 90112.

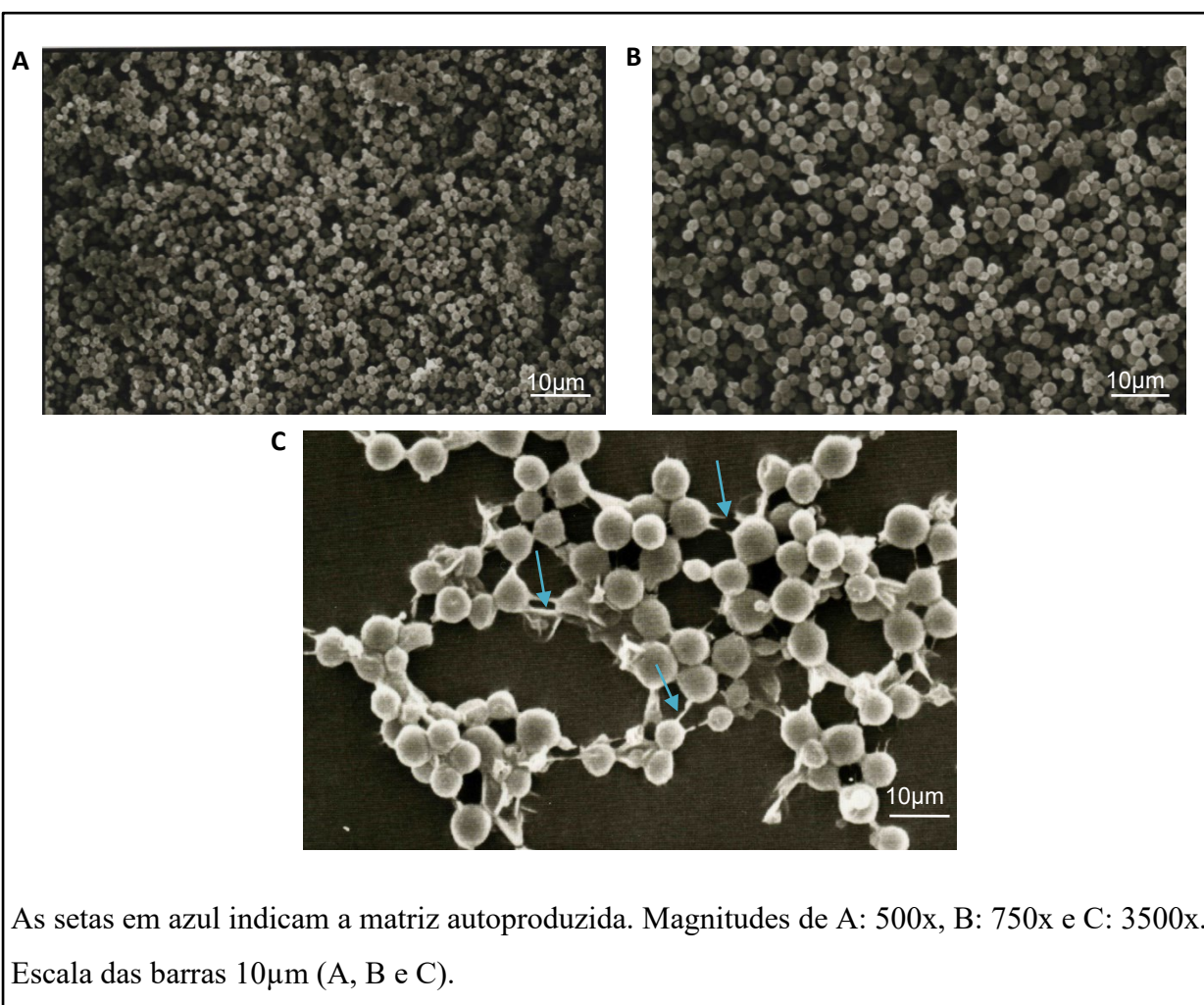
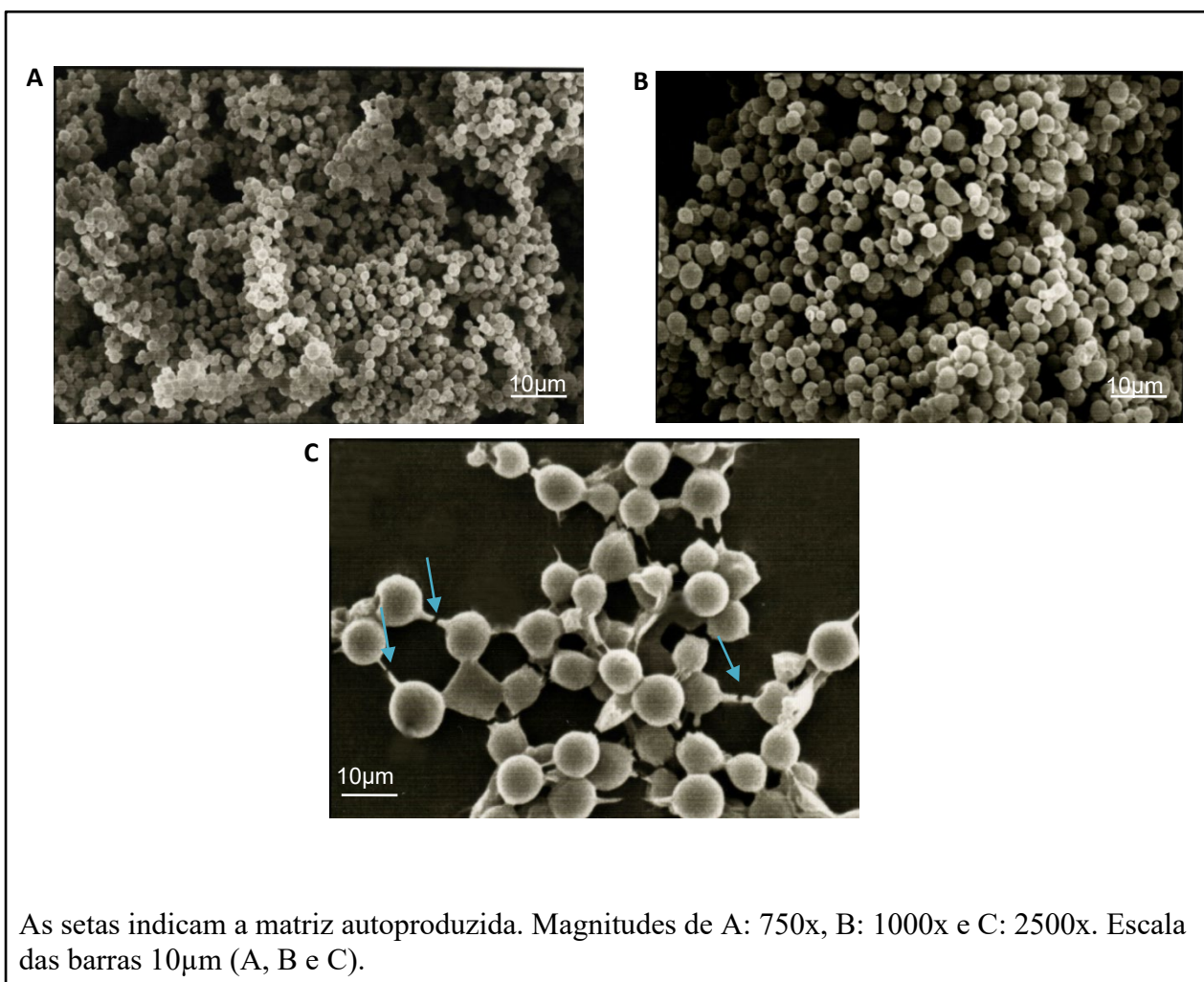
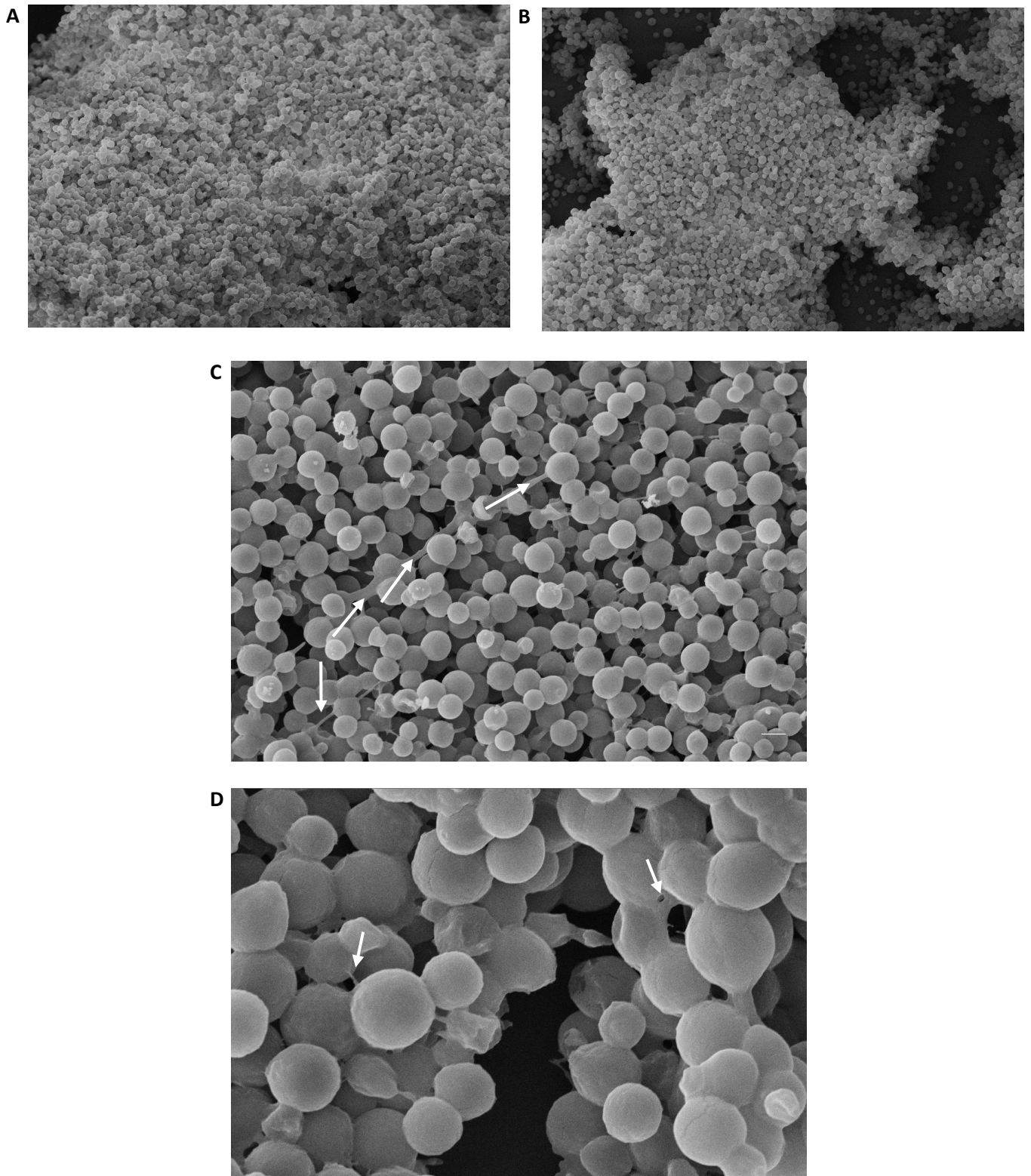


Figura 5. Eletromicrografia dos biofilmes de *C. gattii* ATCC 56990.



A formação de biofilme dos isolados ambientais e de pássaros foi demonstrada por MEV e para tanto, dois isolados foram selecionados, 21.2 e CER, identificados como *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* sorotipo A e *Cryptococcus gattii*, respectivamente. As lamínulas contendo os isolados compreenderam uma densa rede de leveduras fortemente ligadas ao vidro, mesmo após intensas lavagens para o processamento do MEV. As figuras 6 e 7 demonstram respectivamente os biofilmes dos isolados 21.2 e CER. Aparentemente, há diferenças quanto à presença de matriz quando se observam as duas figuras. *C. neoformans* aparentemente forma mais matriz do que *C. gattii*.

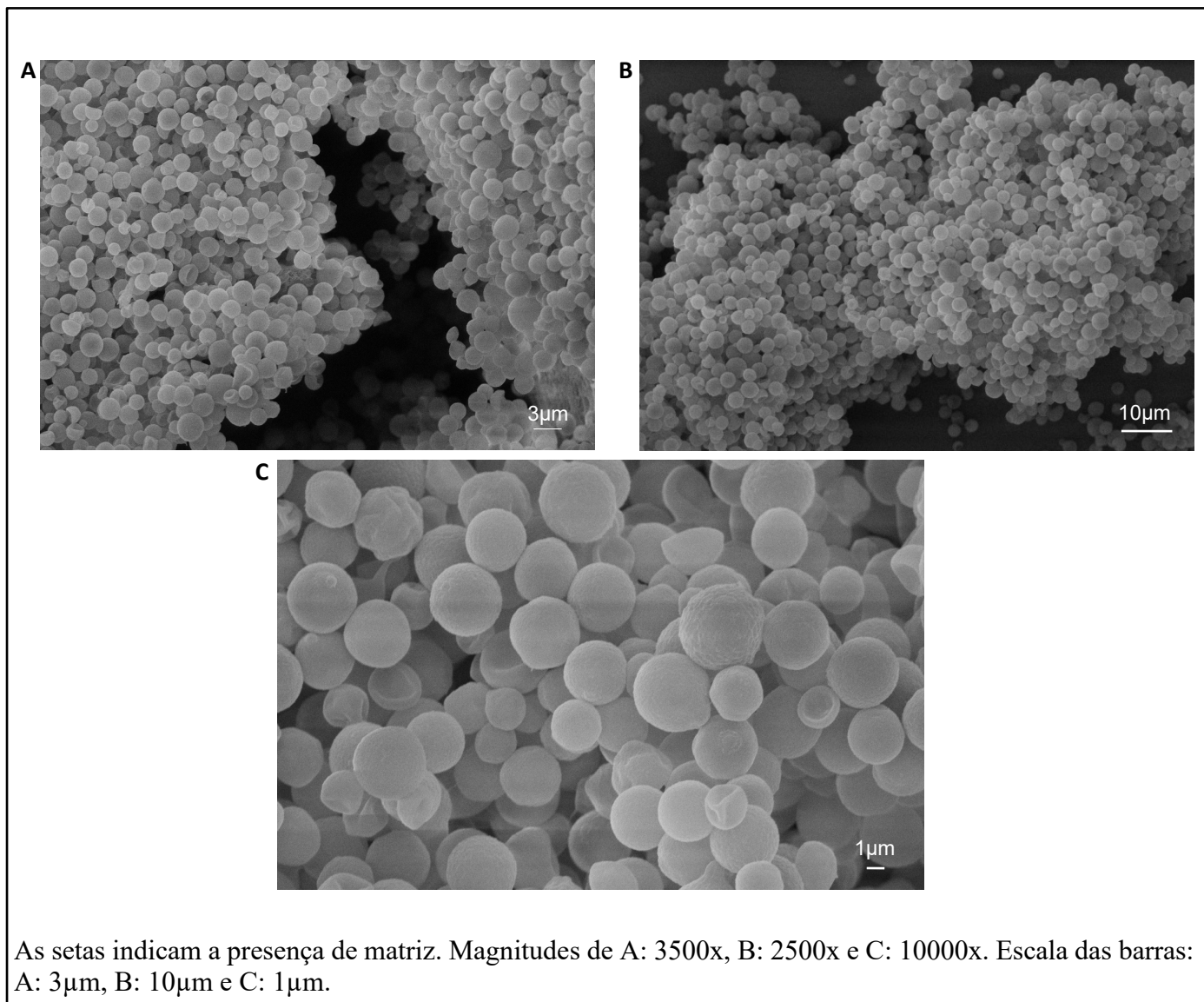
Figura 6. Eletromicrografia dos biofilmes do isolado 21.2.



As setas indicam a presença de matriz. Magnitudes de A: 1500x, B: 1500x, C: 4000x e D: 10000x. Escala das barras: A e B: 10 μ m, C: 3 μ m e D: 1 μ m.

Matriz extra polimérica foi vista nas imagens envolvendo as células criptocócicas (Fig. 6C e 6D). Com a ampliação da imagem foi possível observar a liberação de polissacarídeo capsular que criou uma matriz exopolissacarídica e consequente formação do biofilme.

Figura 7. Eletromicrografia dos biofilmes do isolado CER.

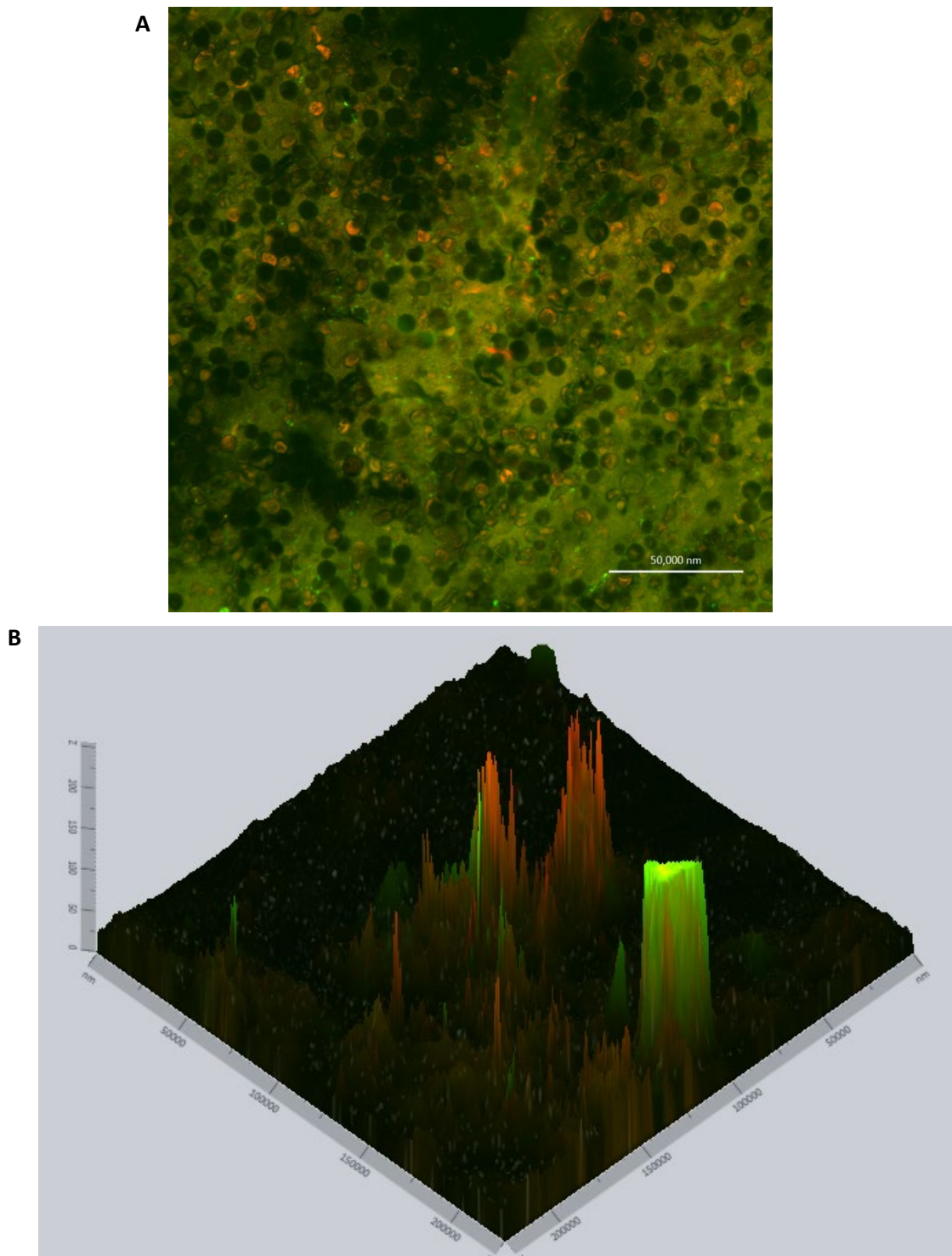


4.2.3 Microscopia confocal a Laser

A microscopia confocal a laser forneceu informações úteis para a determinação da viabilidade/atividade das células aderidas a superfície de vidro, bem como a análise da espessura do biofilme com a utilização de dois fluorocromos, FUN-1 e Concanavalina A conjugada ao AlexaFluor 488. O FUN-1 foi aplicado para determinar a atividade/viabilidade, pois permite a observação de estruturas metabolicamente ativas nas células fúngicas. Em associação, a Con A conjugada à Alexafluor 488 se liga especificamente a polissacarídeos da parede celular.

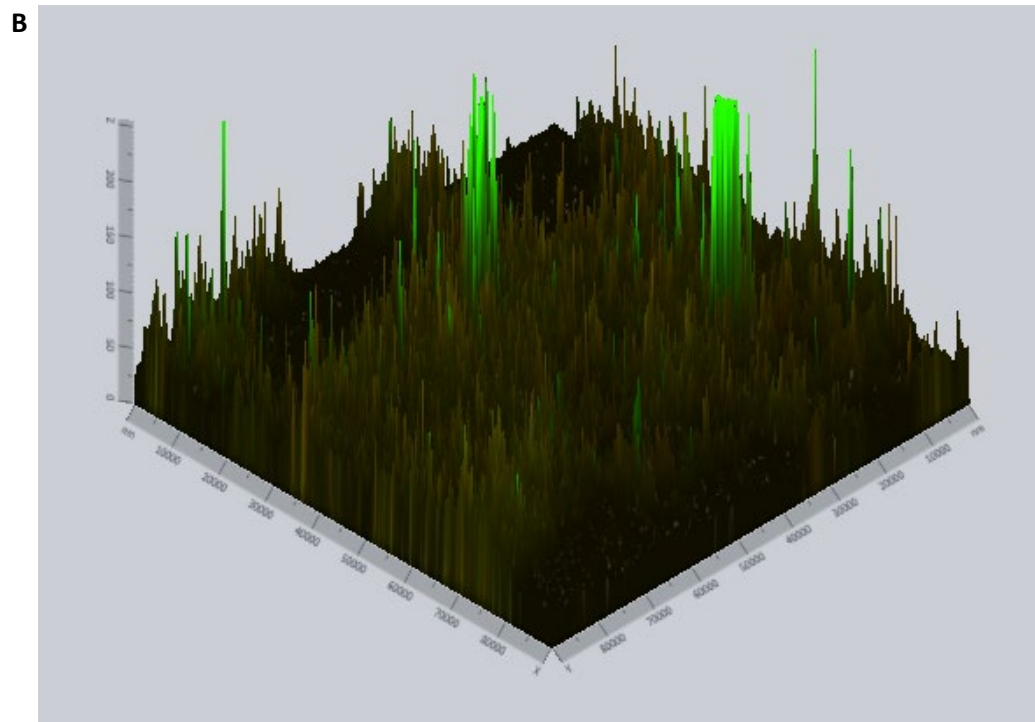
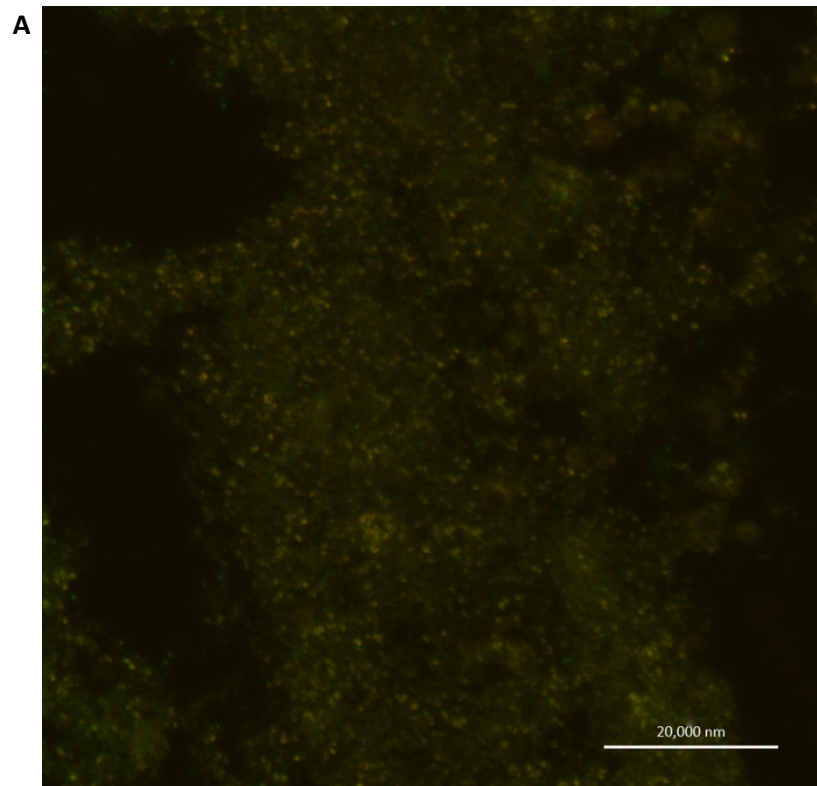
Imagens de um biofilme maduro de *C. neoformans* ATCC 90112 e *C. gattii* ATCC 56990 foram adquiridas por microscopia confocal. A cor amarela alaranjada devido à coloração por FUN-1, representa agregados densos no citoplasma de células metabolicamente ativas, enquanto que a coloração verde resulta da ligação da Concanavalina A à glicose e manose da parede celular fúngica (Figuras 8A e 9A). Imagens ortogonais dos biofilmes de ambas as cepas foram analisadas para determinar a espessura e arquitetura do biofilme. As secções da imagem tridimensional mostraram que o biofilme da cepa de *C. neoformans* ATCC 90112 tem espessura de 10µm (Figura 8B) e *C. gattii* ATCC 56990 tem espessura de 5,4 µm (Figura 8B).

Figura 8. Observação ao microscópio confocal a laser de células do biofilme da cepa *C. neoformans* ATCC 90112.



Parede celular marcada por Con A (concentração final de 25 μ g/mL). Células viáveis coradas por FUN-1 (concentração final de 10 μ M). Barras, 50 μ m.

Figura 9. Observação ao microscópio confocal a laser de células do biofilme da cepa *C. gattii* ATCC 56990.



Parede celular marcada por Con A (concentração final de 25µg/mL). Células viáveis coradas por FUN-1 (concentração final de 10µM). Barras, 20µm.

4.3. Determinação da atividade metabólica do biofilme pelo ensaio de redução do XTT

A cinética da formação de biofilme em placas de microdiluição de poliestireno por isolados de *Cryptococcus* spp. inclusos neste estudo foram comparadas utilizando o ensaio colorimétrico de redução do XTT para determinar a atividade metabólica.

Durante o período de adesão (5h), as leveduras de *Cryptococcus* spp. se tornaram firmemente aderidas à superfície plástica (Figuras 10A). No estágio intermediário (12h), a população fúngica aumentou, formando uma monocamada celular, iniciando assim o processo de formação do biofilme (Figuras 10B). Durante o estágio de maturação (24-72h), o crescimento fúngico envolve a formação de microcolônias constituídas por células agrupadas, resultando em estruturas compactas aderidas à superfície plástica (Figura 10C e 10D).

A partir da cinética foi possível observar que todas as amostras produziram biofilme entre 24 a 72h. Os resultados revelam que a formação inicial do biofilme foi observada antes das 5 horas de incubação, que inclui o período de adesão. Ao longo de um período de 12 a 24h, um biofilme continuamente crescente foi observado. A cinética de formação do biofilme foi semelhante para todas as amostras analisadas e não demonstrou diferenças estatísticas significantes (Figura 11 A, B e C). As amostras de *C. gattii* (CER e ATCC 56990) apresentaram maior absorbância no tempo inicial de adesão quando comparadas com outras amostras de *C. neoformans* (Figura 11 A, B e C) e permaneceram mais altas até o final da formação do biofilme (Figura 11A). Apesar das amostras 5.1, 21.1 e 21.2 de *C. neoformans* apresentarem uma menor absorbância no tempo inicial de adesão quando comparadas com as amostras de *C. gattii* (Figura 11A), esses três isolados de *C. neoformans* tiveram um crescente desenvolvimento na formação do biofilme até 72h (Figura 11B).

Paralelamente, em cada intervalo de tempo, também se monitorou a quantidade de células viáveis. Os biofilmes foram raspados e plaqueados conforme descrito no item 3.7 e o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi expresso em log₁₀ CFU/mL. Não houve diferença estatística significativa entre as amostras testadas (Figura 12).

Figura 10. Imagens do microscópio óptico invertido da cinética de formação de biofilme de *Cryptococcus* spp. após subseqüentes lavagens com PBS.

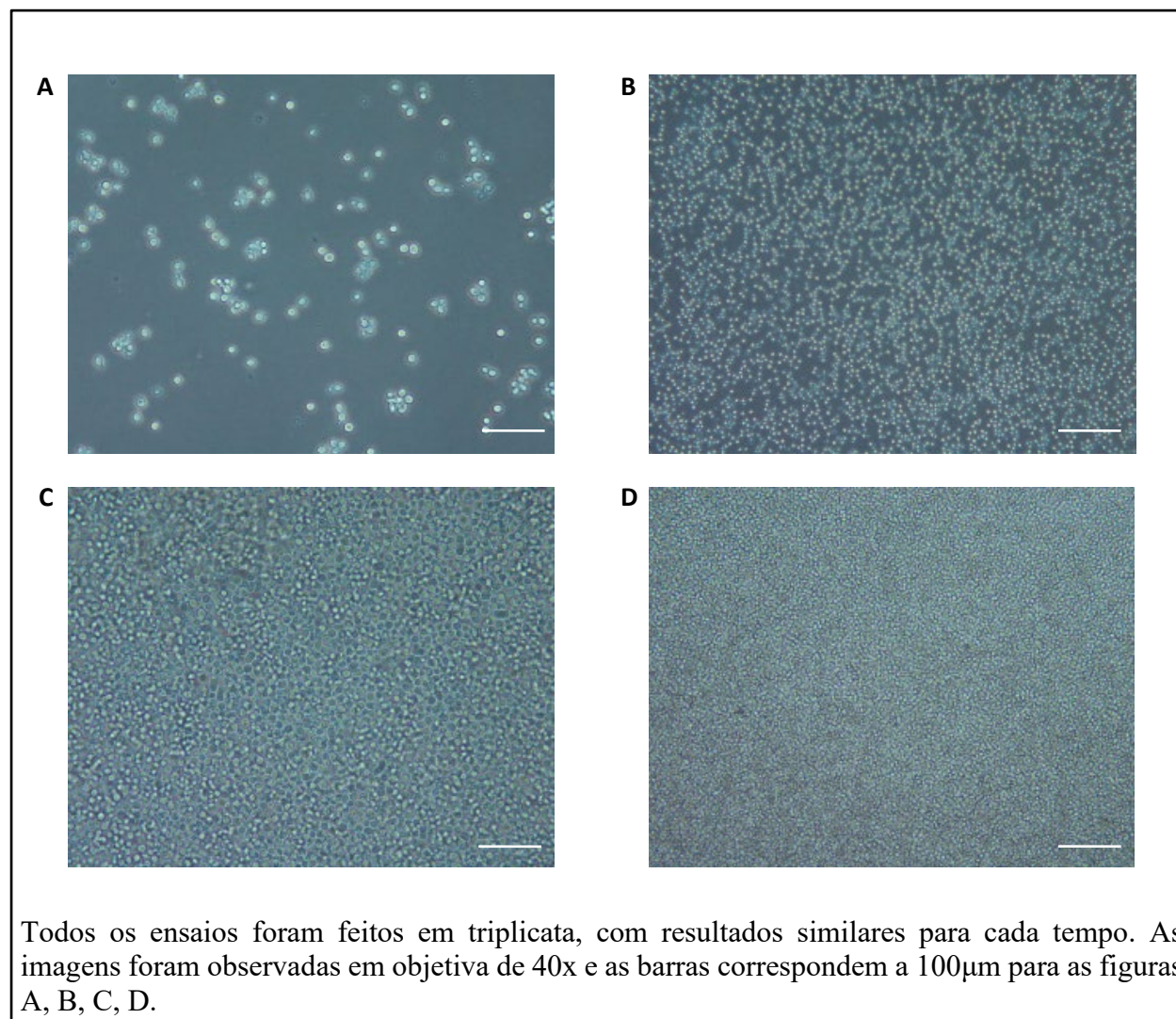
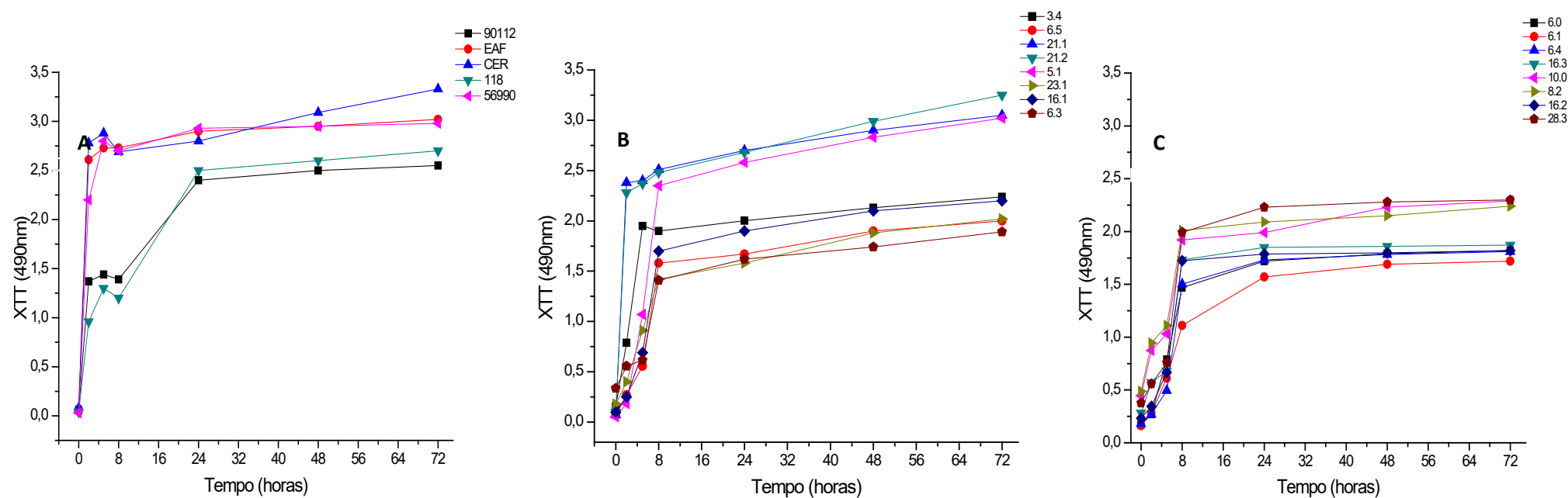
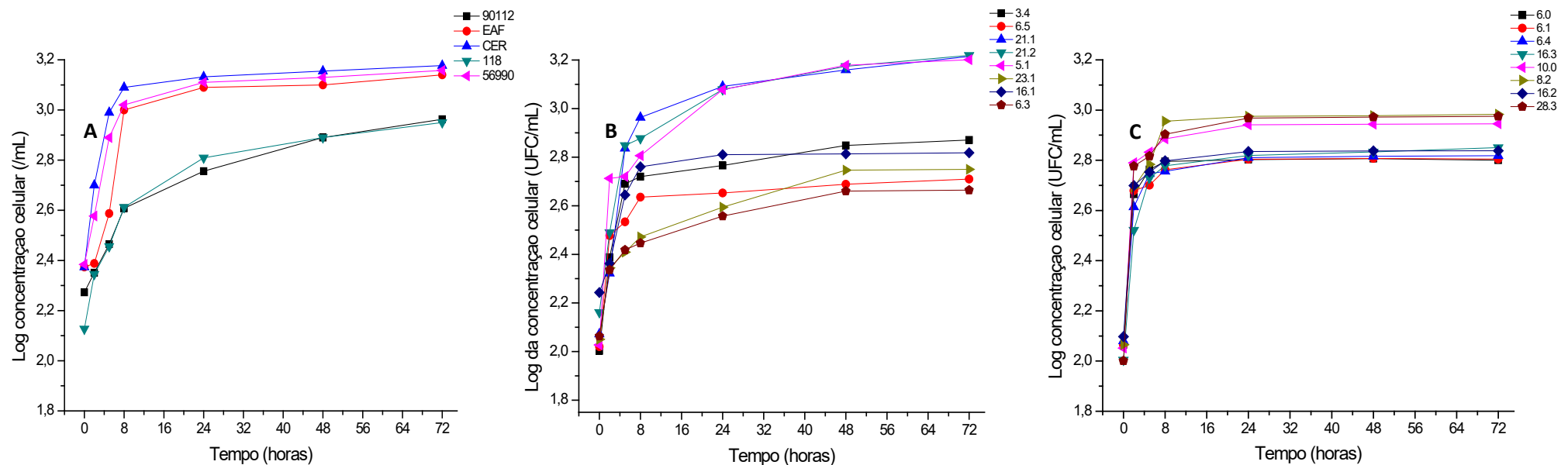


Figura 11. Cinética da formação de biofilme por *Cryptococcus* spp. em placas de microdiluição, conforme determinado pelo ensaio de redução do XTT.



Cada ponto representa a média de três medidas de absorbância à 490nm em leitor de microtitulação (iMark™ Microplate Reader; BIO-RAD). Nenhuma diferença estatística significativa foi observada entre as amostras testadas ($p>0,05$).

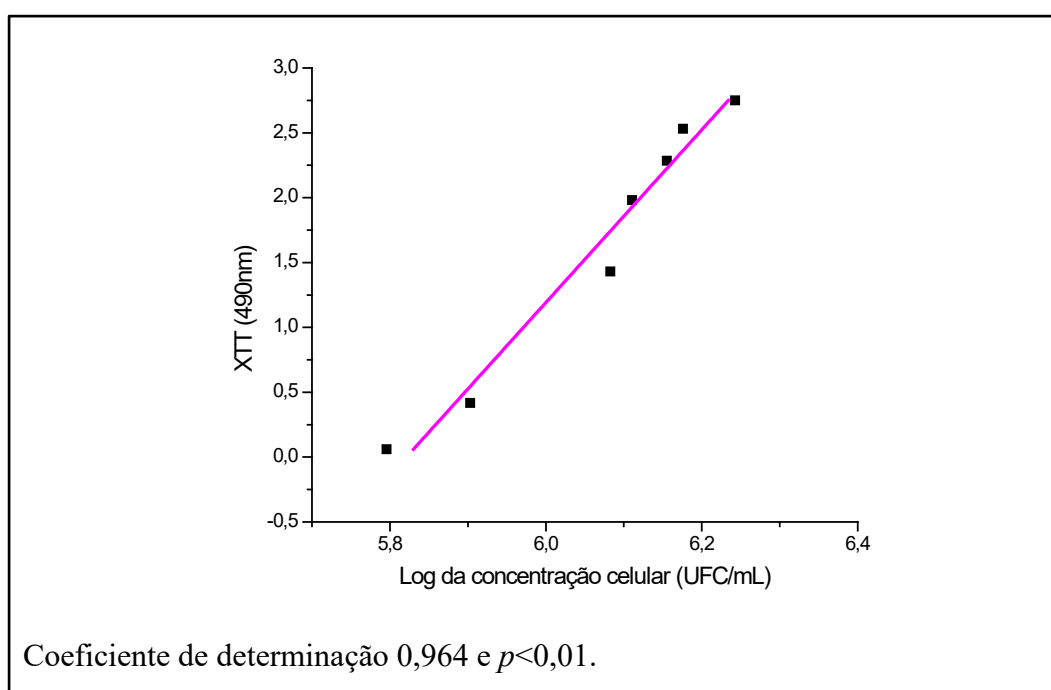
Figura 12. Cinética da formação de biofilme por *Cryptococcus* spp. em placas de microdiluição, conforme determinado pela contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).



O experimento foi realizado em duplicata, e cada ponto representa a média desses valores. Nenhuma diferença estatística significativa foi observada entre as amostras testadas ($p>0,05$).

A fim de compararmos as metodologias (XTT e UFC) empregadas no trabalho, a cepa de *C. neoformans* ATCC 90112 foi incubada a 37°C em intervalos de tempo: 0, 2, 5, 8, 24, 48 e 72h. Em cada intervalo, a análise quantitativa da produção de biofilme foi submetida aos ensaios de XTT e UFC em triplicata e em experimentos independentes. A partir dos resultados obtidos foram elaboradas análises estatísticas a fim de verificar com maior confiabilidade a relação entre os métodos utilizados. O coeficiente de determinação entre os métodos foi de 0,964 e $p < 0,01$ (Figura 13).

Figura 13. Relação entre o ensaio de XTT e log da concentração celular avaliada a partir da contagem de UFC para o biofilme da cepa ATCC 90112



Os resultados da análise estatística mostraram ainda que há uma forte correlação entre os ensaios de XTT e UFC, comprovado pelo coeficiente de determinação de 0,964.

4.4. Sensibilidade de *Cryptococcus* spp. a drogas antifúngicas

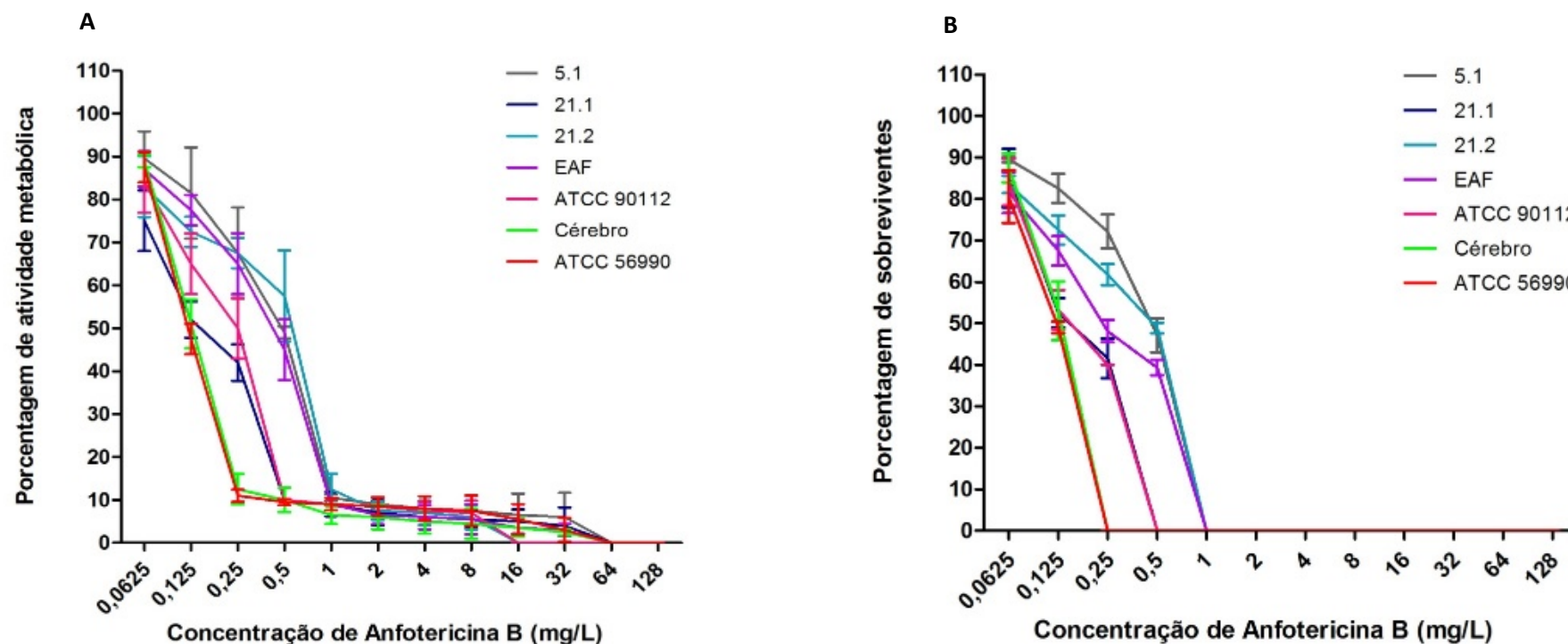
Para avaliar a sensibilidade das células fúngicas no modo planctônico a drogas antifúngicas, na prevenção da formação do biofilme e em biofilmes maduros, cinco isolados foram selecionados: 5.1, 21.1, 21.2, CER (Cérebro), EAF, bem como as cepas de *C. neoformans* ATCC 90112 e a cepa de *C. gattii* ATCC 56990.

4.4.1. Efeito das drogas antifúngicas em células planctônicas de *Cryptococcus* spp.

O efeito antifúngico de AMB e maitenina foram testados em células planctônicas de *Cryptococcus* spp. usando os ensaios de atividade metabólica pela redução de XTT e ensaio de morte. As células com atividade metabólica abaixo de 10% foram consideradas mortas, comparando com os controles negativos (MARTINEZ e CASADEVALL, 2006).

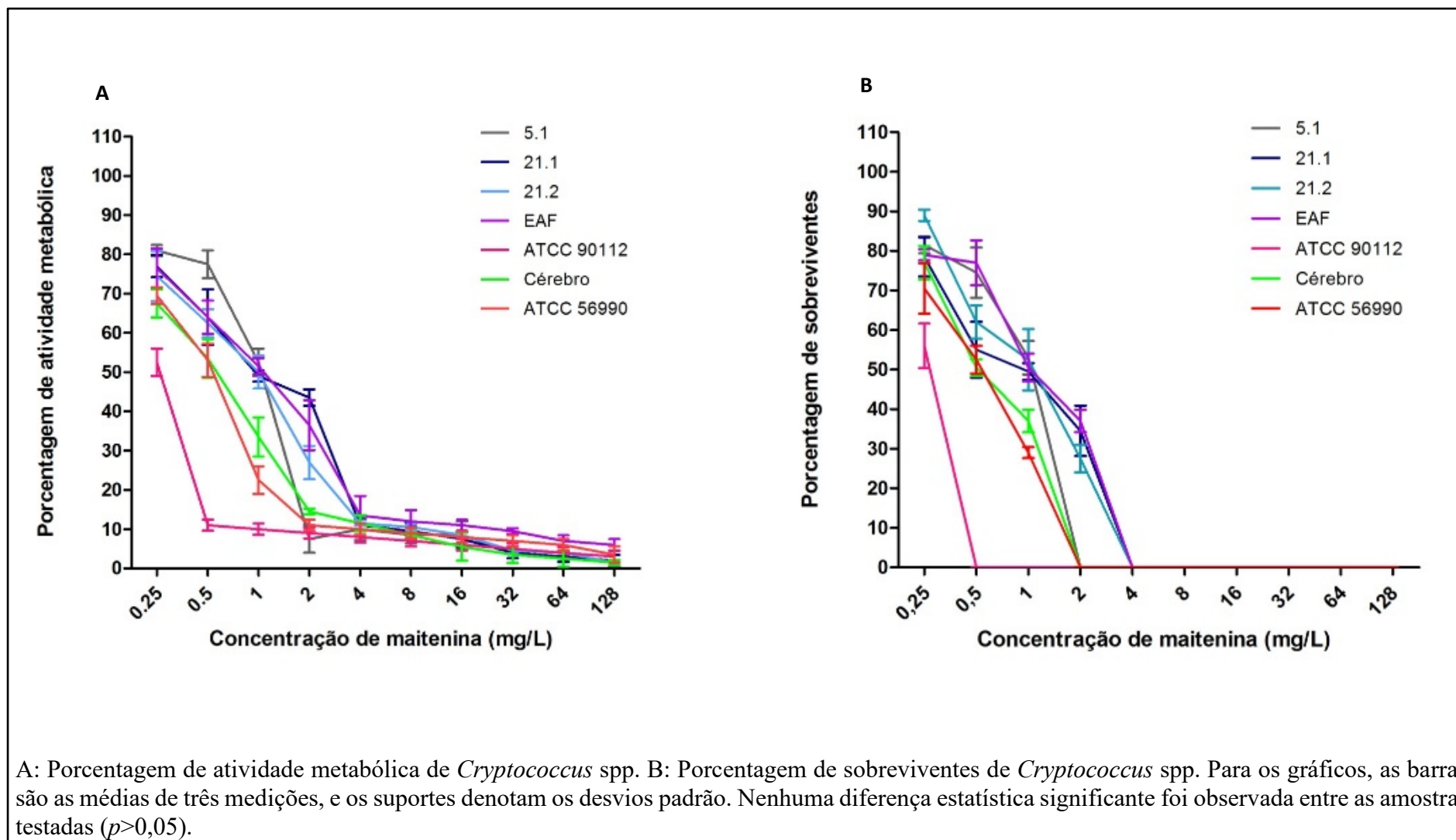
Para AMB, a faixa de concentração inibitória mínima (CIM) das amostras de *Cryptococcus* spp. variou de 0,25-1,00mg/L, conforme demonstra a figura 14 A e B. Já para maitenina a faixa de CIM das amostras de *Cryptococcus* spp. variou de 0,50-4,00mg/L, conforme demonstra a figura 15 A e B.

Figura 14. Células planctônicas de *Cryptococcus* spp. tratadas com AMB.



A: Porcentagem de atividade metabólica de *Cryptococcus* spp. B: Porcentagem de sobreviventes de *Cryptococcus* spp. Para os gráficos, as barras são as médias de três medições, e os suportes denotam os desvios padrão. Nenhuma diferença estatística significativa foi observada entre as amostras testadas ($p>0,05$).

Figura 15. Células planctônicas de *Cryptococcus* spp tratadas com maitenina.



4.4.2. Efeito das drogas antifúngicas na prevenção da formação do biofilme de *Cryptococcus* spp.

O efeito antifúngico de AMB e maitenina foi testado na prevenção da formação de biofilme de *Cryptococcus* spp. usando os ensaios de atividade metabólica pela redução de XTT e ensaio de morte. As células com atividade metabólica abaixo de 10% foram consideradas mortas, comparando com os controles negativos (MARTINEZ e CASADEVALL, 2006).

As atividades metabólicas na prevenção da formação de biofilme de *Cryptococcus* spp foram reduzidas em aproximadamente 50% após o tratamento que variou de 2,00-8,00mg/L de AMB, conforme demonstra a figura 16 A e B. Já para maitenina a faixa de concentração para as amostras de *Cryptococcus* spp. variou de 4,00-16,00mg/L, conforme demonstra a figura 17 A e B.

Figura 16. Biofilmes em formação de *Cryptococcus* spp. tratados com AMB.

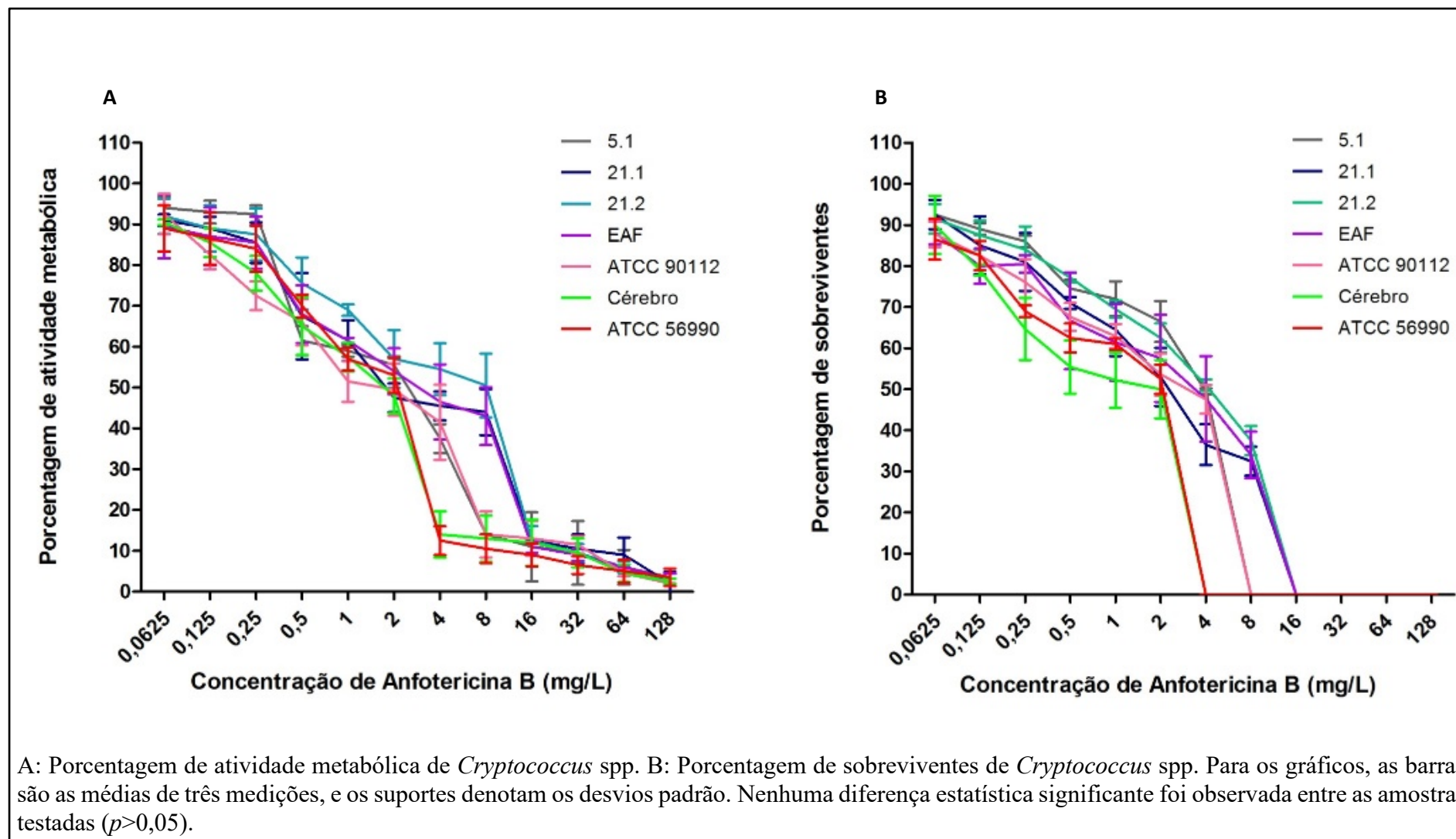
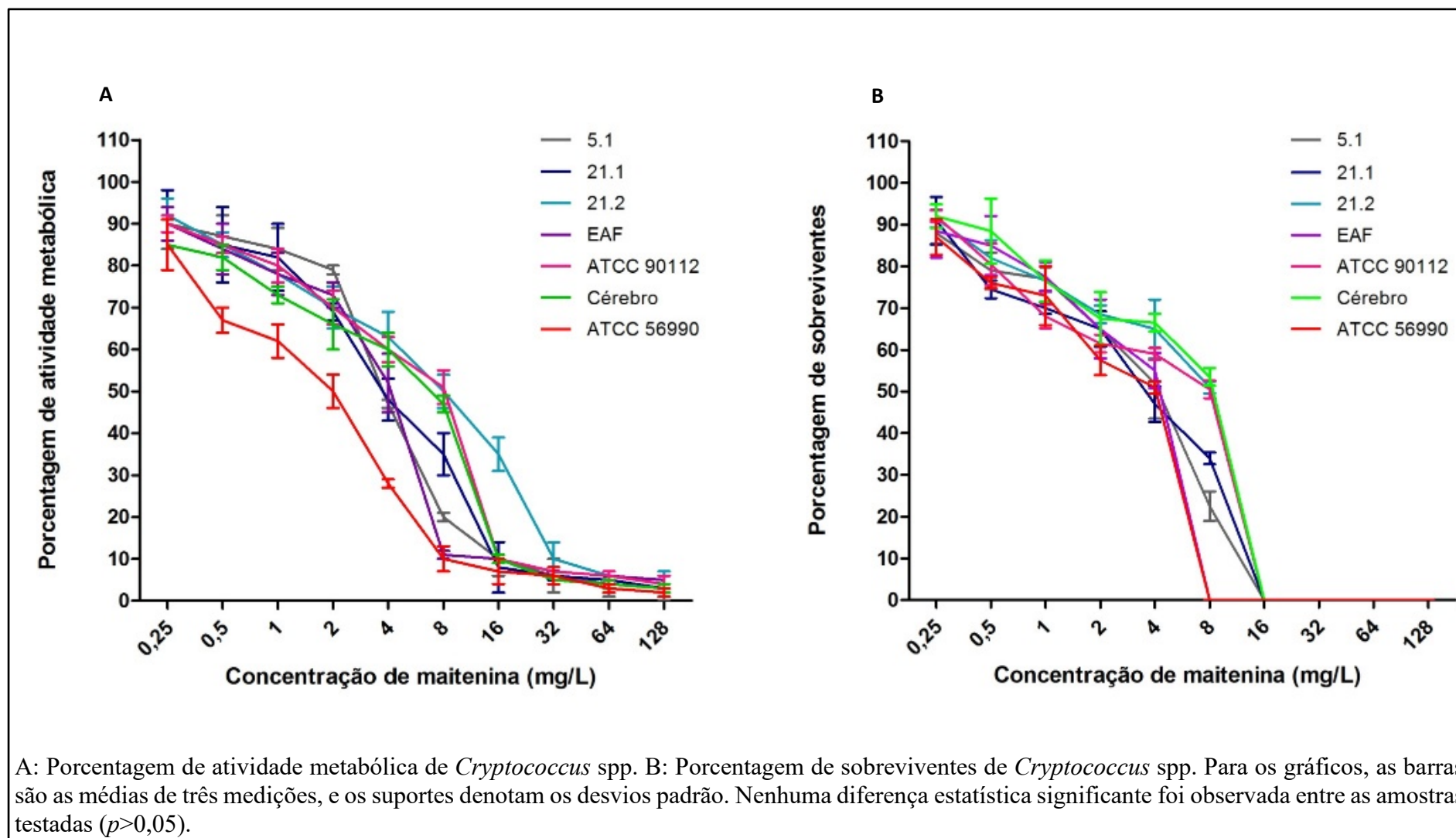


Figura 17. Biofilmes em formação de *Cryptococcus* spp. tratados com maitenina.



4.4.3. Efeito das drogas antifúngicas em biofilmes maduros de *Cryptococcus* spp.

O efeito antifúngico de AMB e maitenina foi testado em biofilmes maduros de *Cryptococcus* spp. usando os ensaios de atividade metabólica pela redução de XTT e ensaio de morte. As células com atividade metabólica abaixo de 10% foram consideradas mortas, comparando com os controles negativos (MARTINEZ e CASADEVALL, 2006).

As atividades metabólicas dos biofilmes de *Cryptococcus* spp foram reduzidas em aproximadamente 50% após o tratamento com 32,00mg/L de AMB (Figura 18A). Não houve unidades formadoras de colônia após o tratamento com 64,00mg/L, conforme demonstrado na figura 18B. O mesmo se pode observar quando analisamos as atividades metabólicas dos biofilmes de *Cryptococcus* spp após o tratamento com maitenina; 50% da atividade metabólica desses biofilmes foram reduzidas após o tratamento com 32,00mg/L de maitenina (Figura 19A) e unidades formadoras de colônia após o tratamento do biofilme com 64,00mg/L de maitenina (Figura 19B).

Figura 18. Biofilmes de *Cryptococcus* spp. tratados com AMB.

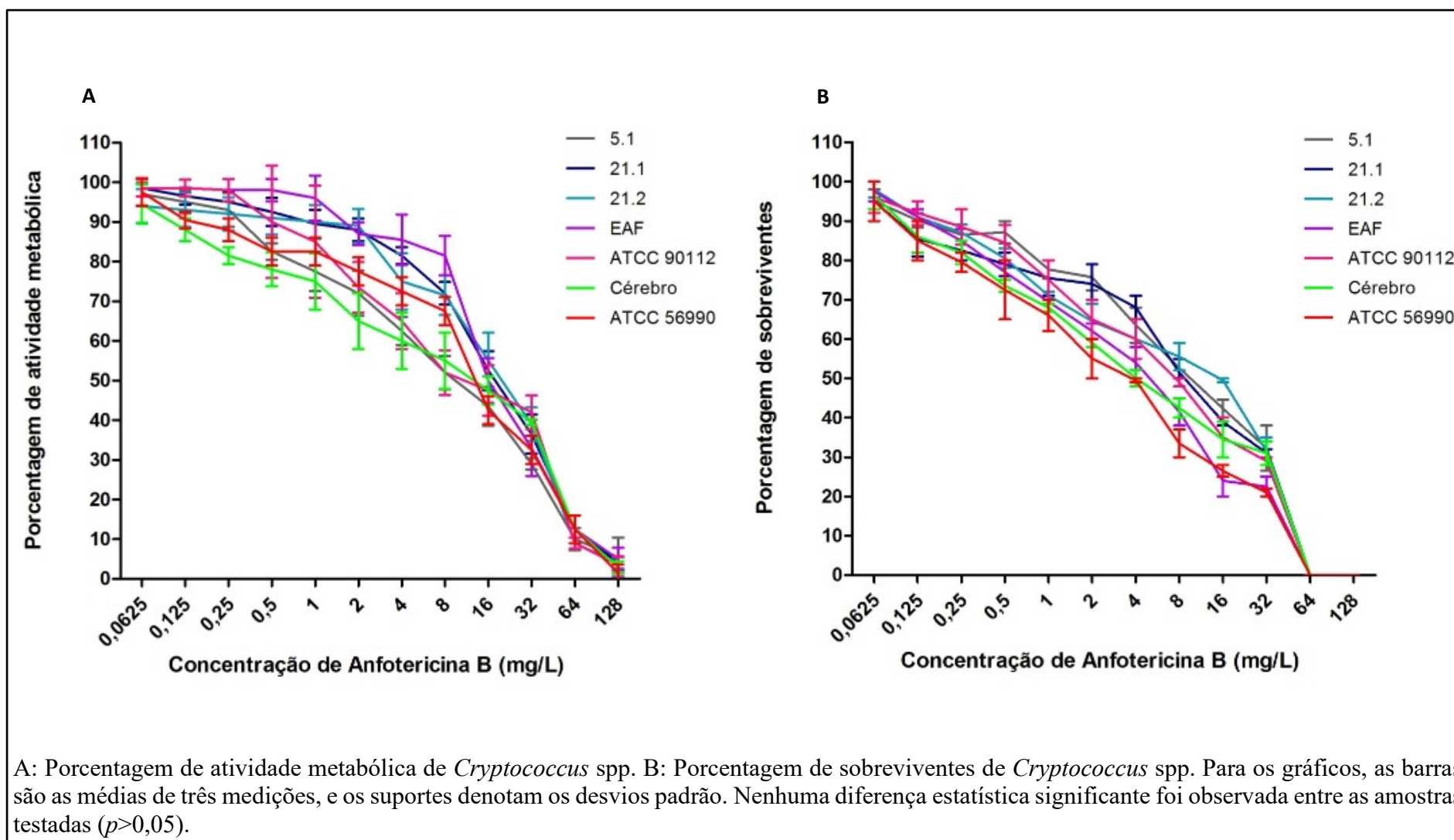
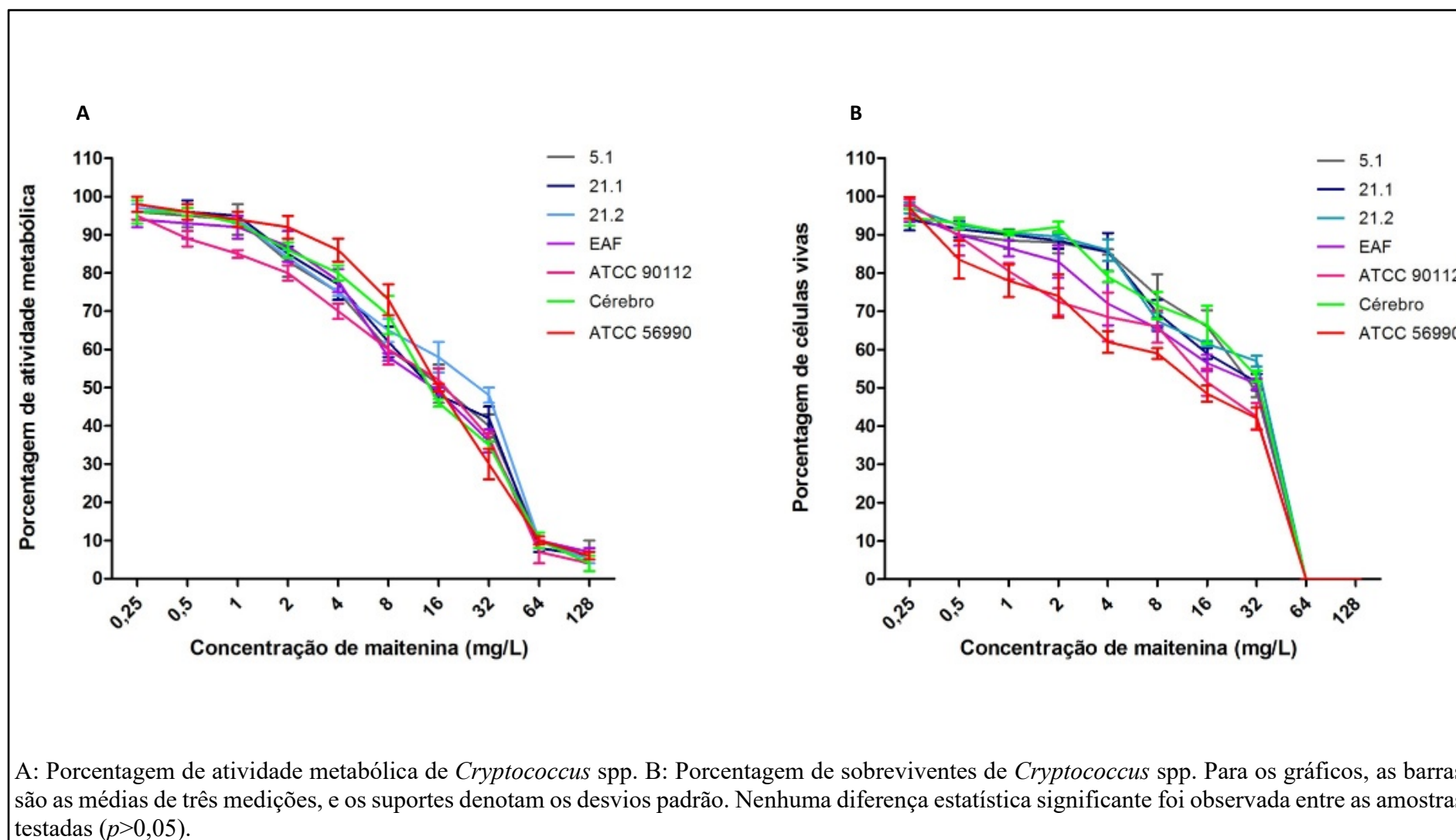


Figura 19. Biofilmes de *Cryptococcus* spp. tratados com maitenina.

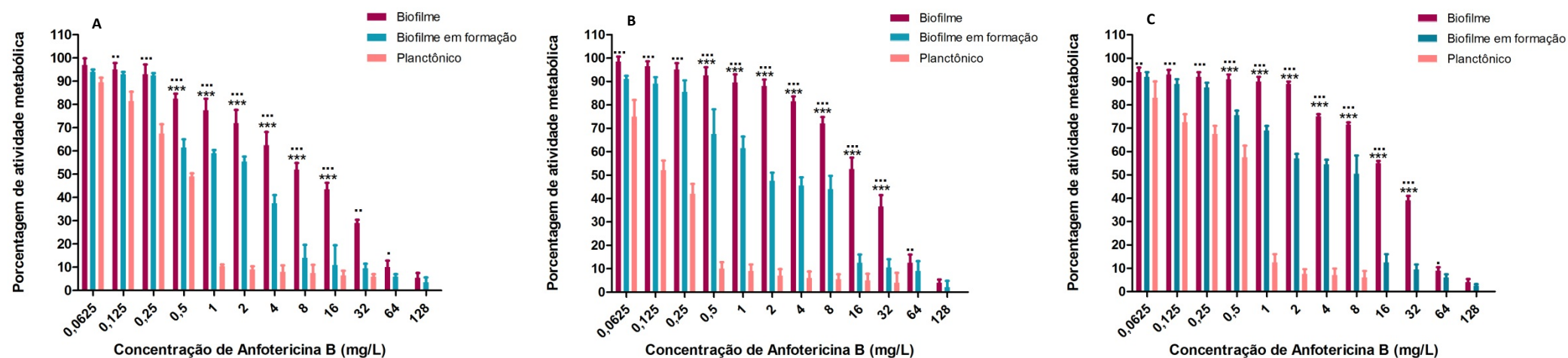


4.5. Comparação da atividade metabólica das células fúngicas no modo planctônico, na prevenção da formação do biofilme e em biofilmes maduros de *Cryptococcus* spp aos antifúngicos AMB e maitenina.

Biofilmes de *C. neoformans* foram significativamente mais resistentes à AMB do que as células planctônicas quando se comparou a atividade metabólica através do ensaio de redução de XTT (Figuras 20 e 21). As atividades metabólicas dos biofilmes dos isolados 21.1 e 21.2 de *C. neoformans* foram reduzidas em aproximadamente 50% somente quando biofilmes foram tratados com 32,00mg/L de AMB. Em contraste, as atividades metabólicas das células planctônicas do isolado 21.1 foram significativamente reduzidos após o tratamento com 0,50mg/L de AMB e para o isolado 21.2 foi de 1,00mg/L. As atividades metabólicas dos biofilmes das amostras EAF e *C. neoformans* ATCC 90112 foram reduzidas em aproximadamente 50% quando biofilmes foram tratados com 16,00mg/L de AMB e para o isolado 5.1 essa redução aconteceu após o tratamento com 8,00mg/L.

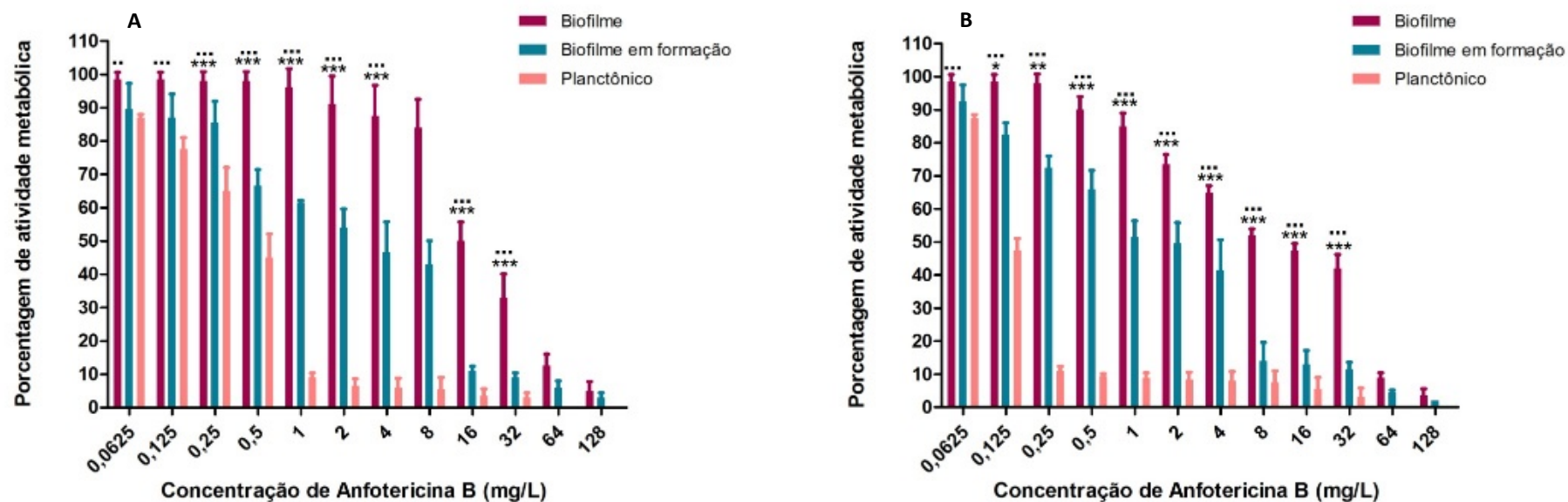
A mesma resistência à AMB foi observada para os biofilmes de *C. gattii* (Figura 22). As atividades metabólicas dos biofilmes das amostras CER e *C. gattii* ATCC 56990 foram reduzidas em aproximadamente 50% somente quando biofilmes foram tratados com 32,00mg/L de AMB. Em contrapartida, as atividades metabólicas das células planctônicas do isolado CER foram significativamente reduzidos após o tratamento com 0,25mg/L de AMB e para o *C. gattii* ATCC 56990 foi de 0,50mg/L.

Figura 20. Porcentagem da atividade metabólica dos isolados ambientais 5.1, 21.1 e 21.2 de *C. neoformans* no modo biofilme, biofilme em formação e células planctônicas determinadas pelo ensaio de redução do sal de XTT para AMB.



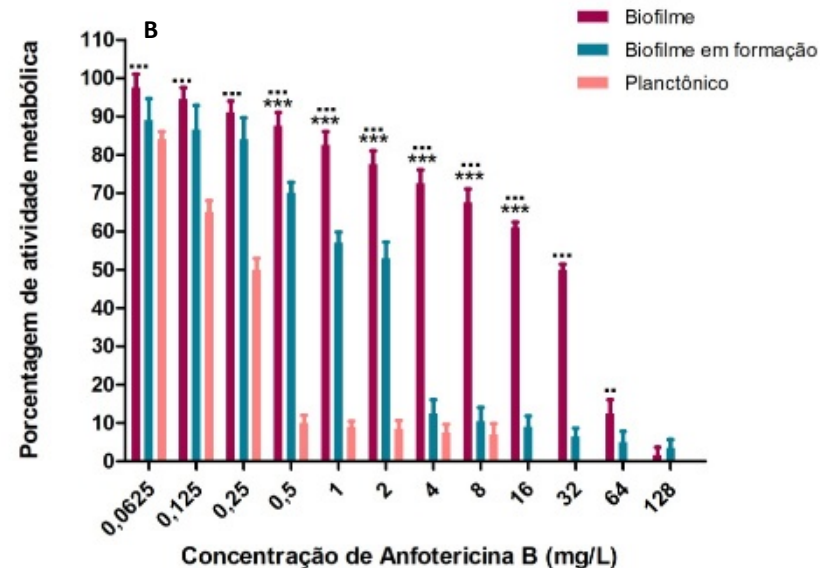
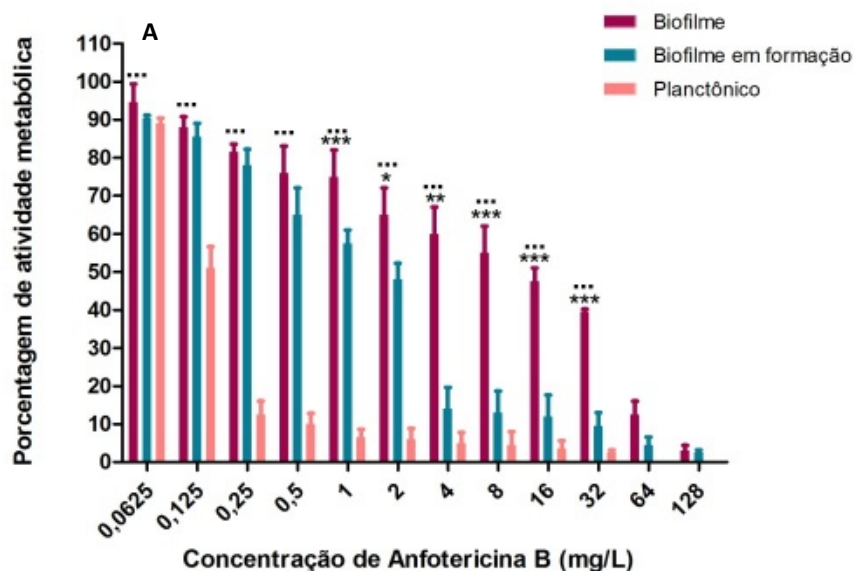
A: Isolado 5.1, B: Isolado 21.1 e C: Isolado 21.2. Para os três gráficos, as barras são as médias de três medições, e os suportes denotam os desvios padrão. Os asteriscos e os pontos indicam o valor p de significância, calculado pela análise de variância e ajustados por meio do teste de Bonferroni (Asteriscos representam valores de p para biofilme vs biofilme em formação; pontos representam valores de p para biofilme vs planctônico).

Figura 21. Porcentagem da atividade metabólica das amostras EAF e ATCC 90112 de *C. neoformans* no modo biofilme, biofilme em formação e células planctônicas determinadas pelo ensaio de redução do sal de XTT para AMB.



A: Isolado EAF e B: Cepa 90112. Para os três gráficos, as barras são as médias de três medições, e os suportes denotam os desvios padrão. Os asteriscos e os pontos indicam o valor p de significância, calculado pela análise de variância e ajustados por meio do teste de Bonferroni (Asteriscos representam valores de p para biofilme vs biofilme em formação; pontos representam valores de p para biofilme vs planctônico).

Figura 22. Porcentagem da atividade metabólica das amostras CER (cérebro) e ATCC 56990 de *C. gattii* no modo biofilme, biofilme em formação e células planctônicas determinadas pelo ensaio de redução do sal de XTT para AMB.



A: Isolado CER e B: Cepa 56990. Para os três gráficos, as barras são as médias de três medições, e os suportes denotam os desvios padrão. Os asteriscos e os pontos indicam o valor p de significância, calculado pela análise de variância e ajustados por meio do teste de Bonferroni (Asteriscos representam valores de p para biofilme vs biofilme em formação; pontos representam valores de p para biofilme vs planctônico).

Biofilmes de *C. neoformans* e *C. gattii* foram também tratados com maitenina. As atividades metabólicas dos biofilmes dos isolados 21.2, EAF e 5.1 de *C. neoformans* foram reduzidas em aproximadamente 50% quando esses biofilmes foram tratados respectivamente com 32,00mg/L, 16,00mg/L e 8,00mg/L de maitenina, respectivamente (Figuras 23 e 24). Quando comparamos os resultados de maitenina com os obtidos após o tratamento dos mesmos isolados com AMB, observamos que o antifúngico natural foi capaz de inibir o biofilme nas mesmas proporções que o antifúngico comercial. O mesmo aconteceu com o biofilme do isolado CER de *C. gattii* que teve sua atividade metabólica reduzida em aproximadamente 50% após tratamento com 32,00mg/L de maitenina.

Já para o isolado 21.1 e a cepa *C. neoformans* ATCC 90112, o tratamento com 16mg/L e 8,00mg/L de maitenina, respectivamente foram suficientes para reduzir em aproximadamente 50% a atividade metabólica dos biofilmes (Figura 23), enquanto que a concentração de AMB foi de 32,00mg/L e 16,00mg/L, respectivamente. A atividade metabólica do biofilme de *C. gattii* ATCC 56990 foi reduzida em aproximadamente 50% quando tratado com 16,00mg/L de maitenina (Figura 25) contra 32,00mg/L de AMB.

Figura 23. Porcentagem da atividade metabólica dos isolados ambientais 5.1, 21.1 e 21.2 de *C. neoformans* no modo biofilme, biofilme em formação e células planctônicas determinadas pelo ensaio de redução do sal de XTT para maitenina.

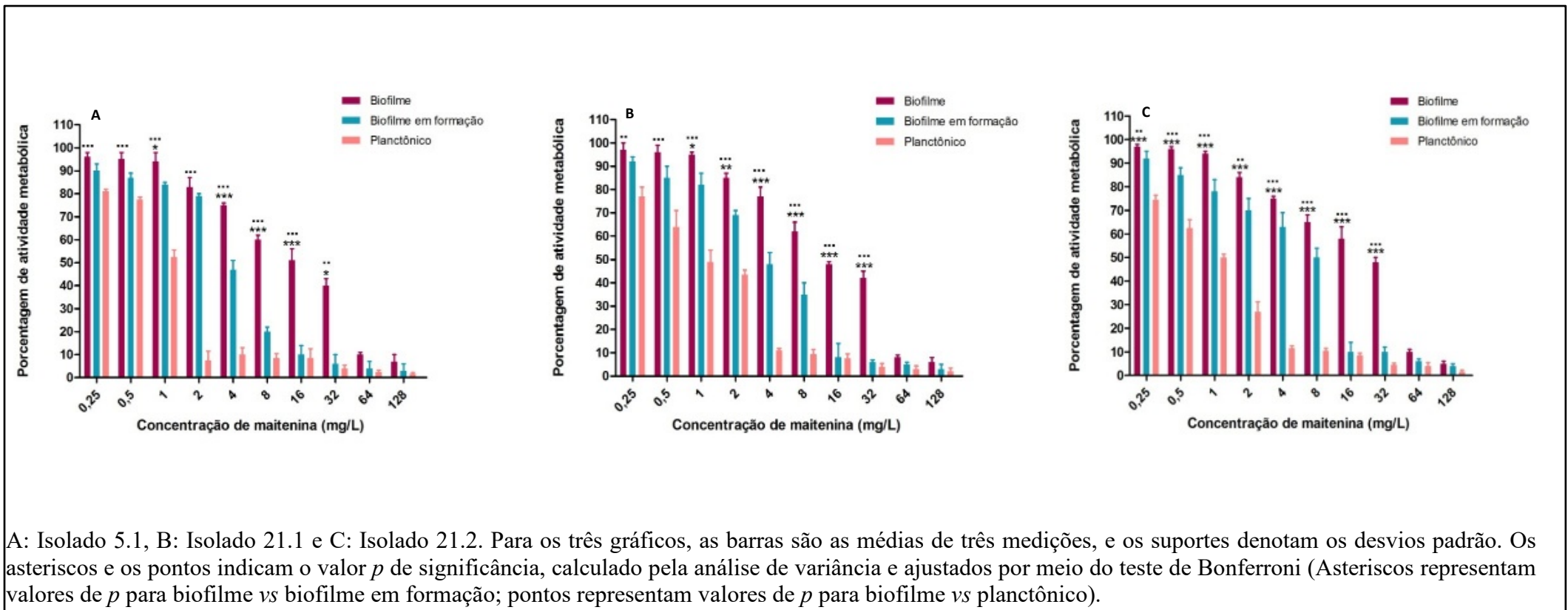
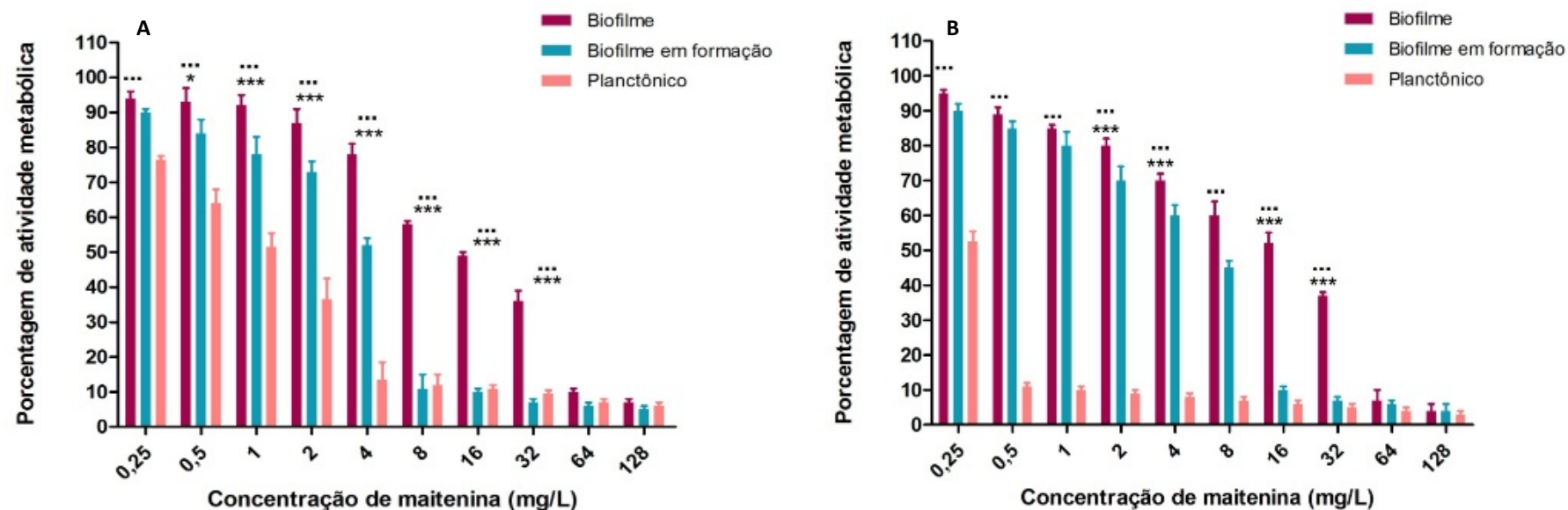
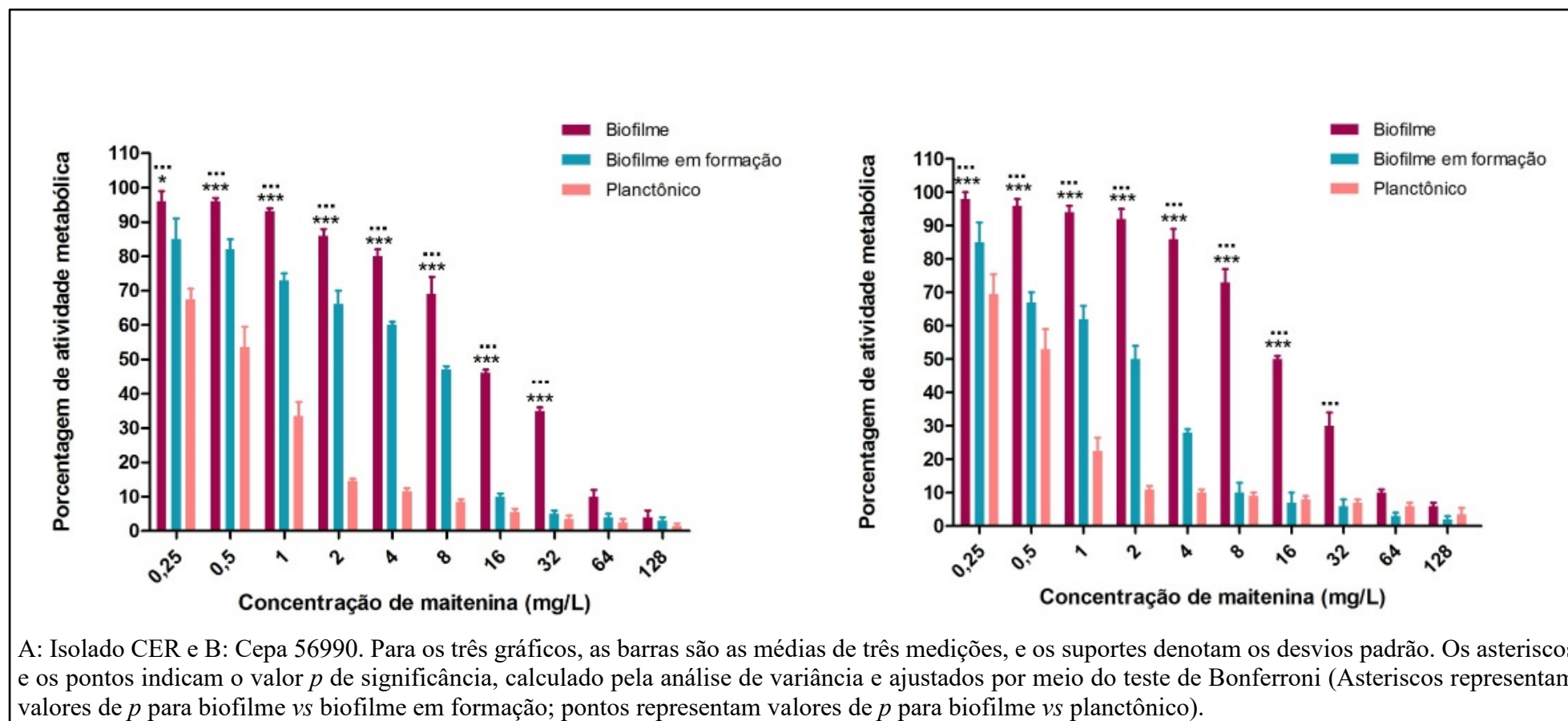


Figura 24. Porcentagem da atividade metabólica das amostras EAF e ATCC 90112 de *C. neoformans* no modo biofilme, biofilme em formação e células planctônicas determinadas pelo ensaio de redução do sal de XTT para maitenina.



A: Isolado EAF e B: Cepa 90112. Para os três gráficos, as barras são as médias de três medições, e os suportes denotam os desvios padrão. Os asteriscos e os pontos indicam o valor p de significância, calculado pela análise de variância e ajustados por meio do teste de Bonferroni (Asteriscos representam valores de p para biofilme vs biofilme em formação; pontos representam valores de p para biofilme vs planctônico).

Figura 25. Porcentagem da atividade metabólica das amostras CER (cérebro) e ATCC 56990 de *C. gattii* no modo biofilme, biofilme em formação e células planctônicas determinadas pelo ensaio de redução do sal de XTT para maitenina.



4.6. Comparação da porcentagem de sobrevivência das células fúngicas no modo planctônico, na prevenção da formação do biofilme e em biofilmes maduros de *Cryptococcus* spp aos antifúngicos AMB e maitenina.

Para confirmar os resultados obtidos no ensaio de redução de XTT, a porcentagem de sobrevivência das células do biofilme ou na prevenção de sua formação, ou na forma planctônica foi determinada por contagem do número de UFC em poços tratados com AMB e maitenina, comparando estes com os números de colônias obtidas a partir de poços não tratados.

A porcentagem de células oriundas de biofilmes de *Cryptococcus* spp foram significativamente mais resistentes à AMB do que as células planctônicas para todas as amostras testadas (Figuras 26, 27 e 28). A porcentagem de células do biofilme foi reduzida em aproximadamente 50% após o tratamento com 16,00mg/L de AMB para os isolados 5.1, 21.1 e 21.2 (Figura 26). A mesma redução foi observada para as amostras EAF, ATCC 90112 (Figura 27) e CER (Figura 28), após o tratamento com 8,00mg/L de AMB. Para a cepa de *C. gattii* ATCC 56990 houve uma redução de 60% na sobrevivência das células do biofilme após o tratamento com 8,00mg/L de AMB (Figura 28).

Figura 26. Porcentagem de sobrevivência dos isolados ambientais 5.1, 21.1 e 21.2 de *C. neoformans* no modo biofilme, biofilme em formação e células planctônicas determinadas pelo ensaio de morte (UFC/mL) para AMB.

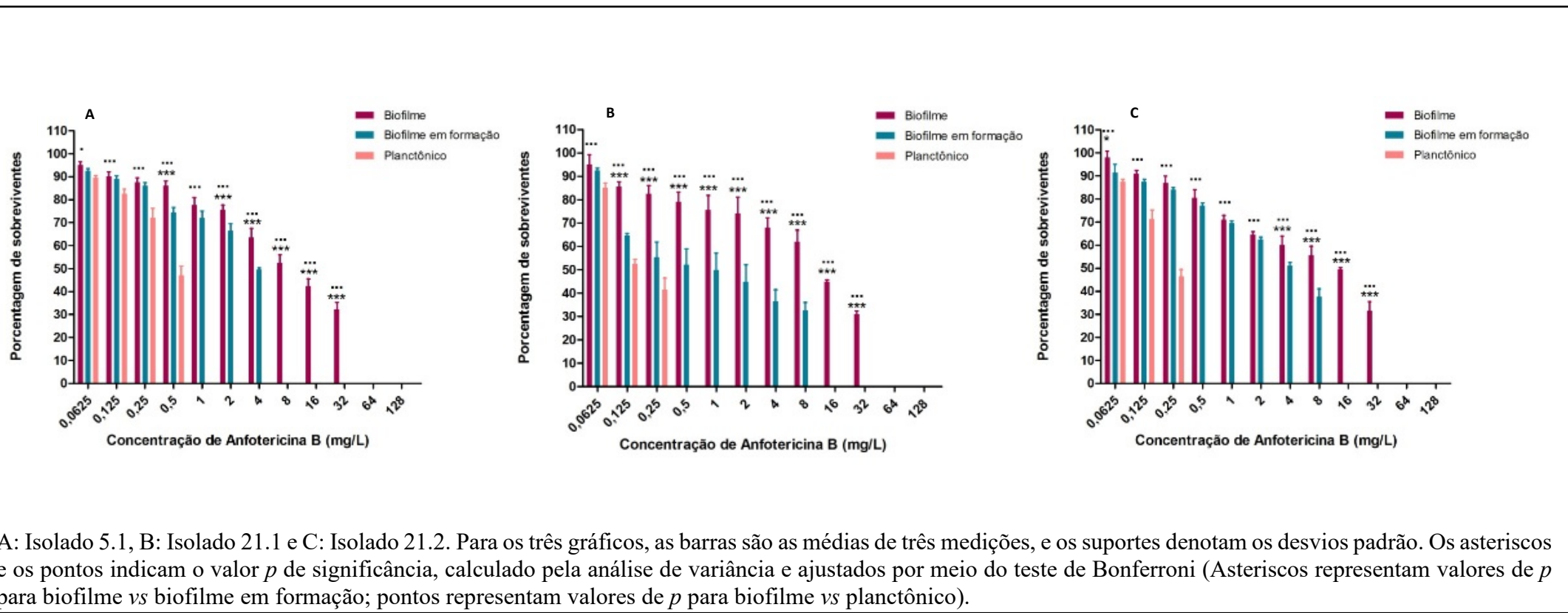
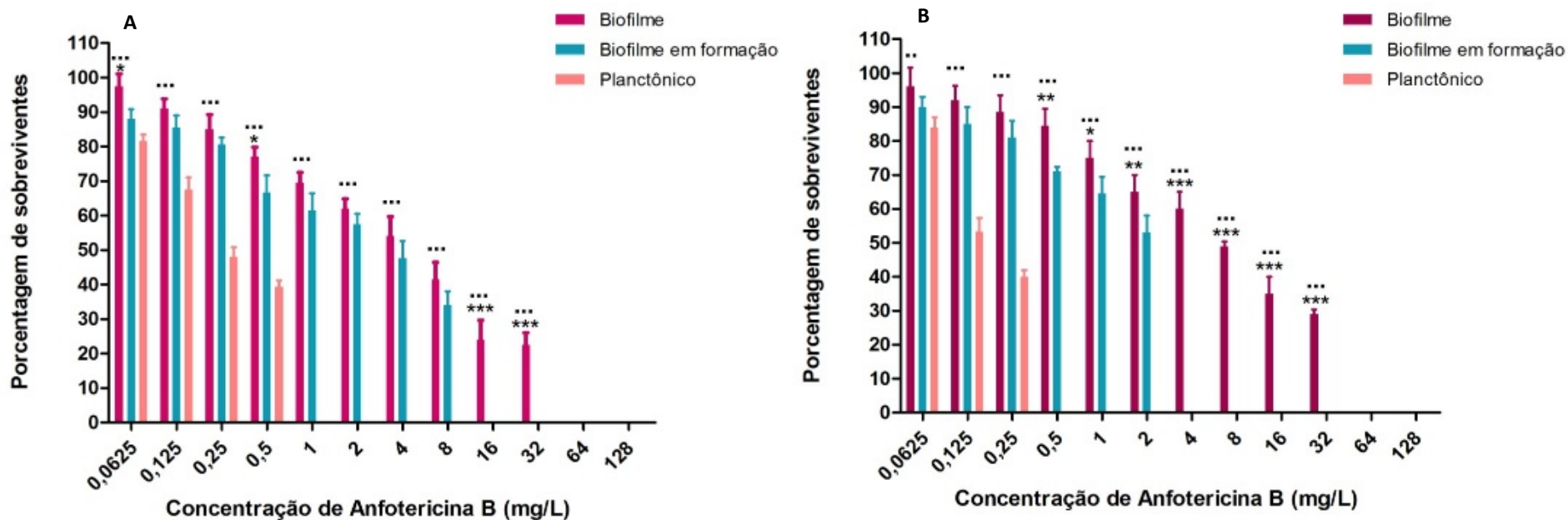
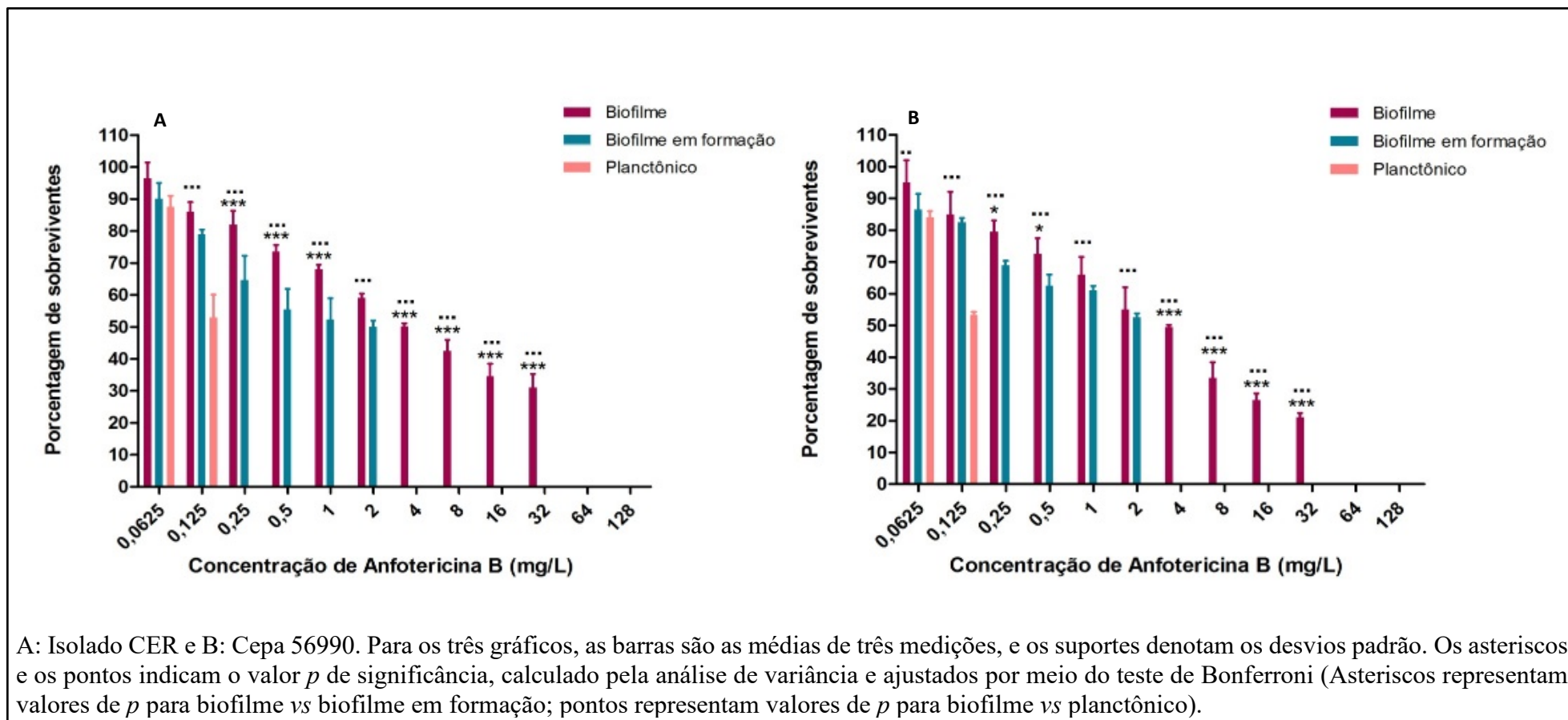


Figura 27. Porcentagem de sobrevivência das amostras EAF e ATCC 90112 de *C. neoformans* no modo biofilme, biofilme em formação e células planctônicas determinadas pelo ensaio de morte (UFC/mL) para AMB.



A: Isolado EAF e B: Cepa 90112. Para os três gráficos, as barras são as médias de três medições, e os suportes denotam os desvios padrão. Os asteriscos e os pontos indicam o valor p de significância, calculado pela análise de variância e ajustados por meio do teste de Bonferroni (Asteriscos representam valores de p para biofilme vs biofilme em formação; pontos representam valores de p para biofilme vs planctônico).

Figura 28. Porcentagem de sobrevivência das amostras CER (cérebro) e ATCC 56990 de *C. gattii* no modo biofilme, biofilme em formação e células planctônicas determinadas pelo ensaio de morte (UFC/mL) para AMB.



Biofilmes de *Cryptococcus* spp foram significativamente mais resistentes à maitenina do que as células planctônicas quando a porcentagem de sobrevivência das células do biofilme e planctônicas foi comparada para todas as amostras testadas (Figuras 29, 30 e 31). A porcentagem de células do biofilme foi reduzida aproximadamente 50% após o tratamento com 32,00mg/L de maitenina para os isolados 5.1 e 21.1 (Figura 29), bem como para as amostras EAF e *C. neoformans* ATCC 90112 (Figura 30) e as amostras CER e *C. gattii* ATCC 56990 (Figura 31). Para o isolado 21.2 houve uma redução de 40% na sobrevivência das células do biofilme após o tratamento com 32,00mg/L de maitenina (Figura 29). Deve-se destacar que células de queratinócitos (NOK) tratadas com concentrações maiores que 32,00mg/L apresentaram viabilidade superior a 60% (GULLO *et al.*, 2012).

Figura 29. Porcentagem de sobrevivência dos isolados ambientais 5.1, 21.1 e 21.2 de *C. neoformans* no modo biofilme, biofilme em formação e células planctônicas determinadas pelo ensaio de morte (UFC/mL) para maitenina.

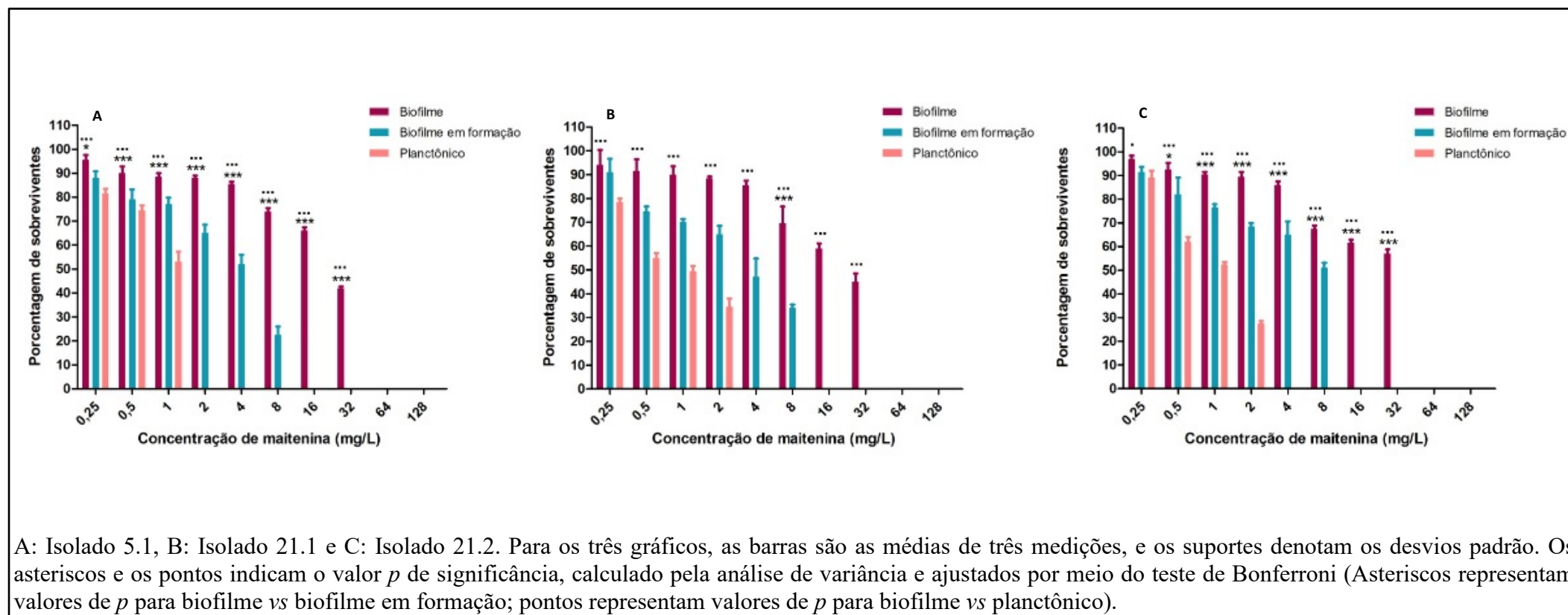
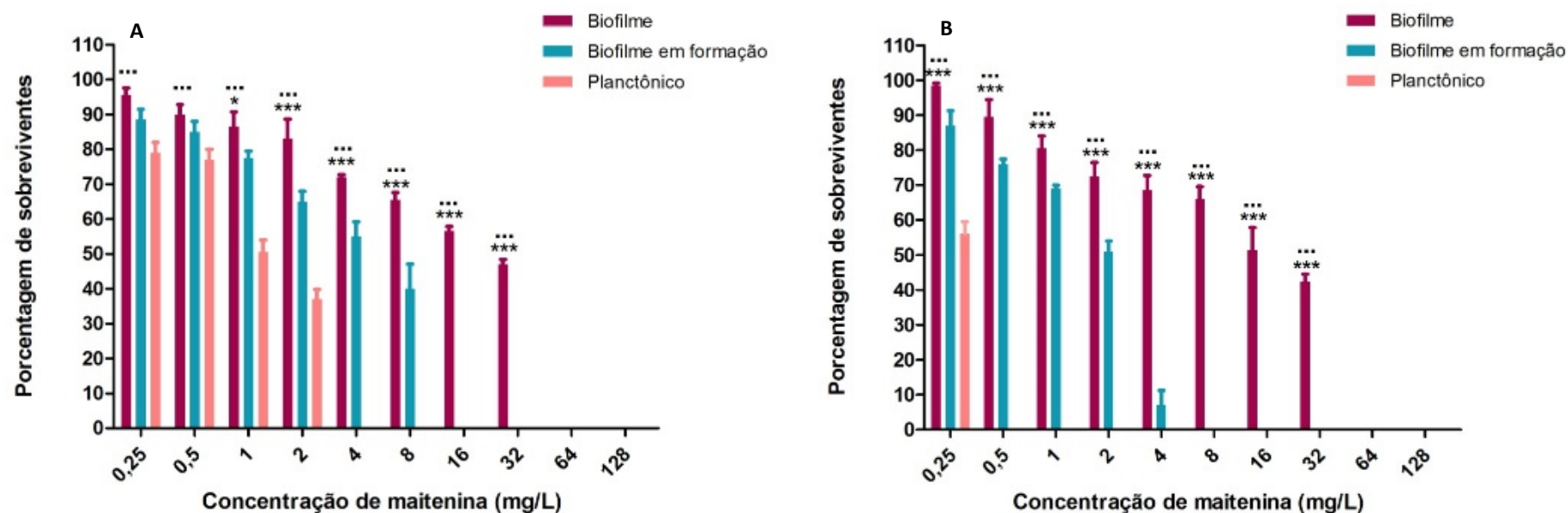
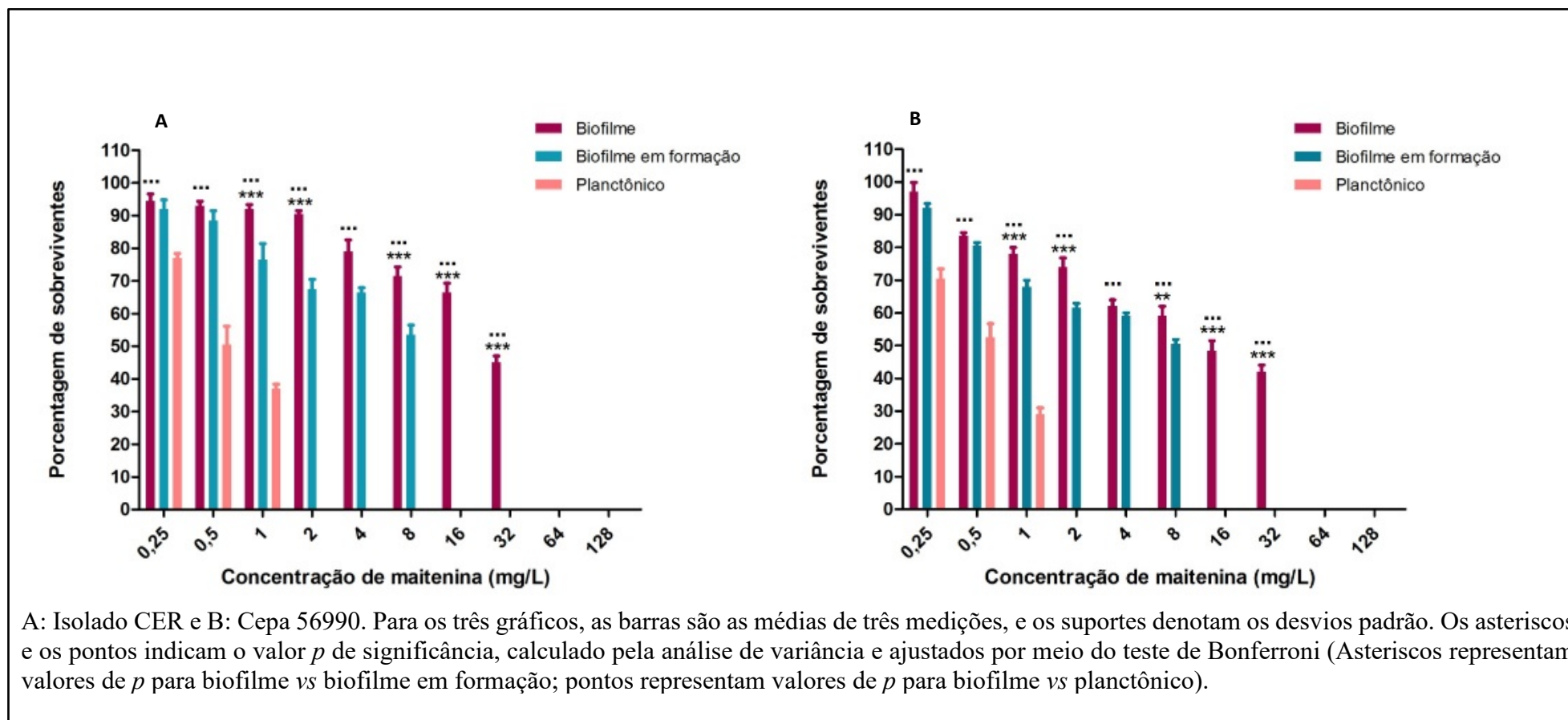


Figura 30. Porcentagem de sobrevivência das amostras EAF e ATCC 90112 de *C. neoformans* no modo biofilme, biofilme em formação e células planctônicas determinadas pelo ensaio de morte (UFC/mL) para maitenina.



A: Isolado EAF e B: Cepa 90112. Para os três gráficos, as barras são as médias de três medições, e os suportes denotam os desvios padrão. Os asteriscos e os pontos indicam o valor p de significância, calculado pela análise de variância e ajustados por meio do teste de Bonferroni (Asteriscos representam valores de p para biofilme vs biofilme em formação; pontos representam valores de p para biofilme vs planctônico).

Figura 31. Porcentagem de sobrevivência das amostras CER (cérebro) e ATCC 56990 de *C. gattii* no modo biofilme, biofilme em formação e células planctônicas determinadas pelo ensaio de morte (UFC/mL) para maitenina.

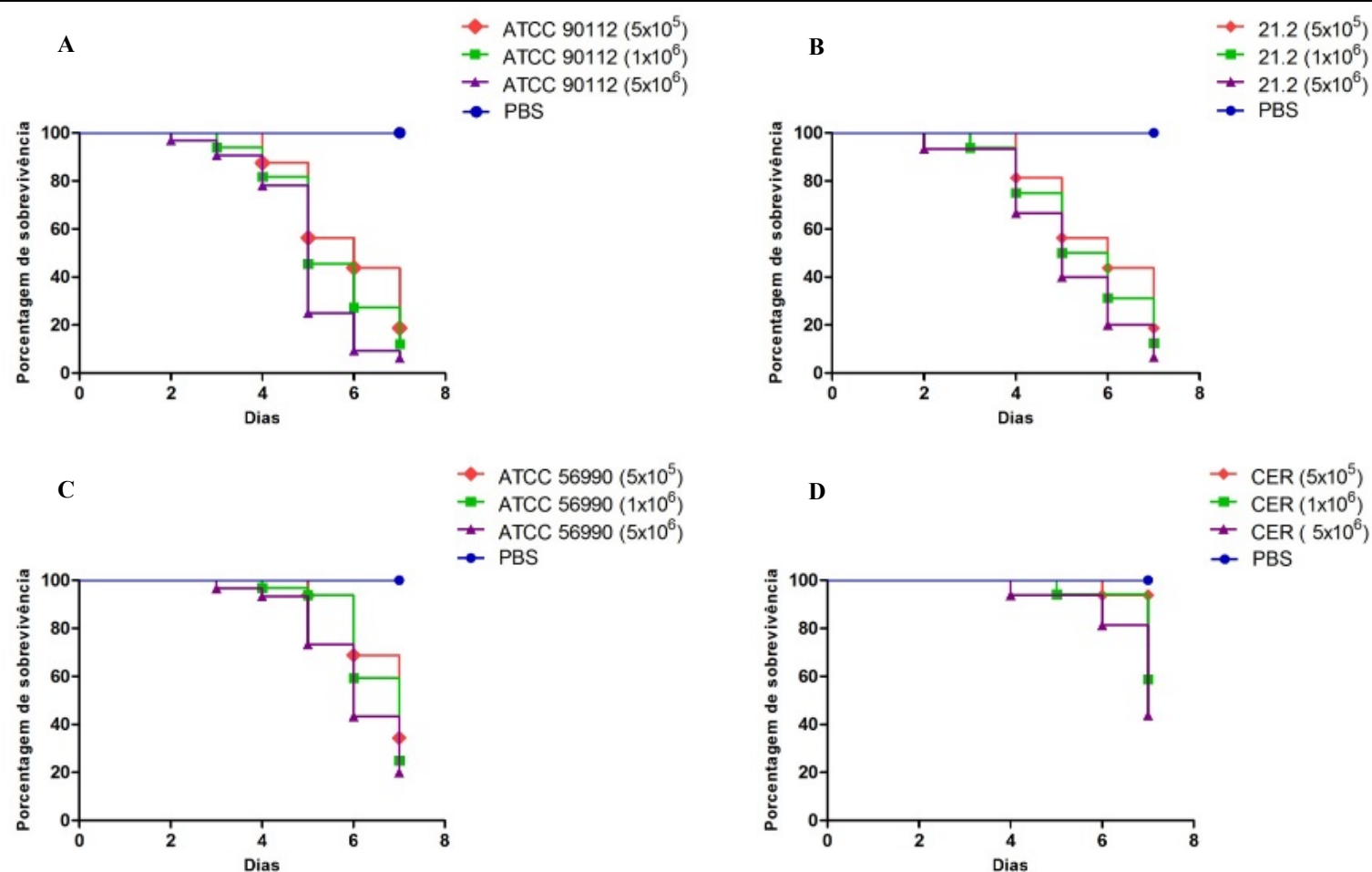


4.7. Ensaio de sobrevivência: Modelo *Galleria mellonella*

G. mellonella foi infectada com diferentes concentrações (5×10^5 , 1×10^6 e 5×10^6 UFC/larva) das leveduras *C. neoformans* ATCC 90112 (Figura 32A), 21.2 (Figura 32B), *C. gattii* ATCC 56990 (Figura 32C) e CER (Figura 32D). A resposta de *G. mellonella* a *C. neoformans* e a *C. gattii* foi dose dependente aumentando de acordo com a concentração (Figura 32). Foi selecionada a concentração 5×10^6 UFC/larva para todas as amostras, que corresponde ao valor em que as larvas não morriam muito tardiamente. Como controle determinou-se a sobrevivência das larvas inoculadas apenas com PBS e larvas infectadas com 5×10^6 UFC/larva mortas com 4% de paraformaldeído por uma hora para avaliar se a morte *G. mellonella* foi causada por uma reação não infecciosa (por exemplo, grande quantidade de leveduras injetadas). Não houve mortes no grupo que recebeu células de *Cryptococcus* spp. mortas pelo paraformaldeído ou do grupo que recebeu PBS (dados não mostrados).

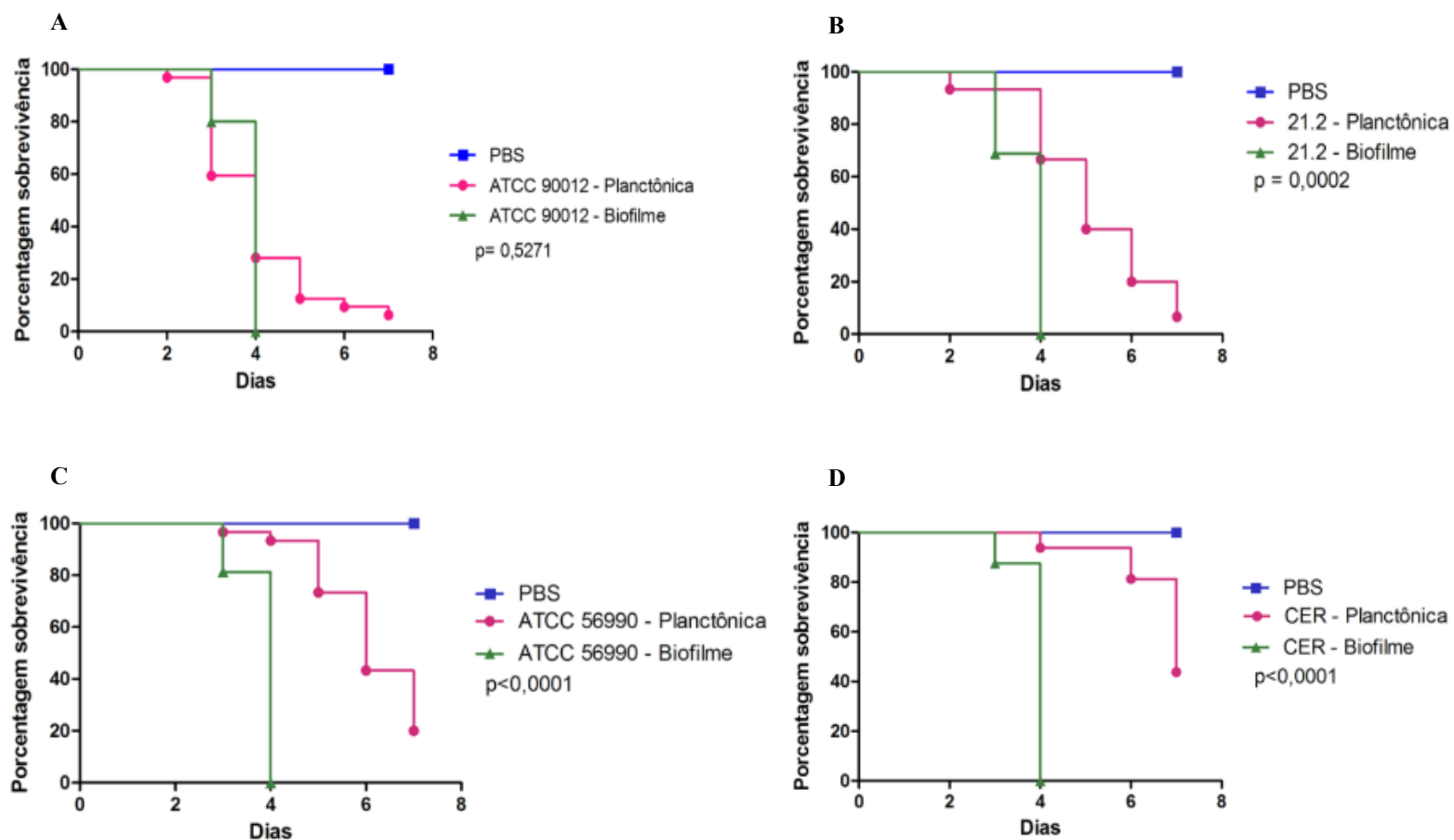
Todas as amostras testadas foram capazes de matar as larvas de *G. mellonella*; tanto as células que passaram pela formação de biofilme quanto as células planctônicas. No entanto, as larvas inoculadas com as células que passaram anteriormente pelo processo de formação de biofilme sobreviveram menos que as larvas infectadas por células que não passaram por esse processo. Isso pode ser demonstrado para os isolados 21.2 de *C. neoformans* (Figura 33B) e CER de *C. gattii* (Figura 33D) e para as cepas ATCC 90112 de *C. neoformans* (Figura 33A) e ATCC 56990 de *C. gattii* (Figura 33C).

Figura 32. Curva de sobrevivência de *G. mellonella* infectadas com distintas concentrações de *C. neoformans* e *C. gattii* e incubadas a 37°C.



Não houve diferença estatística entre as concentrações das amostras testadas ($p > 0,05$). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Figura 33. Porcentagem de sobrevivência de *G. mellonella* infectadas com biofilmes e células planctônicas de *C. neoformans* e *C. gattii*.



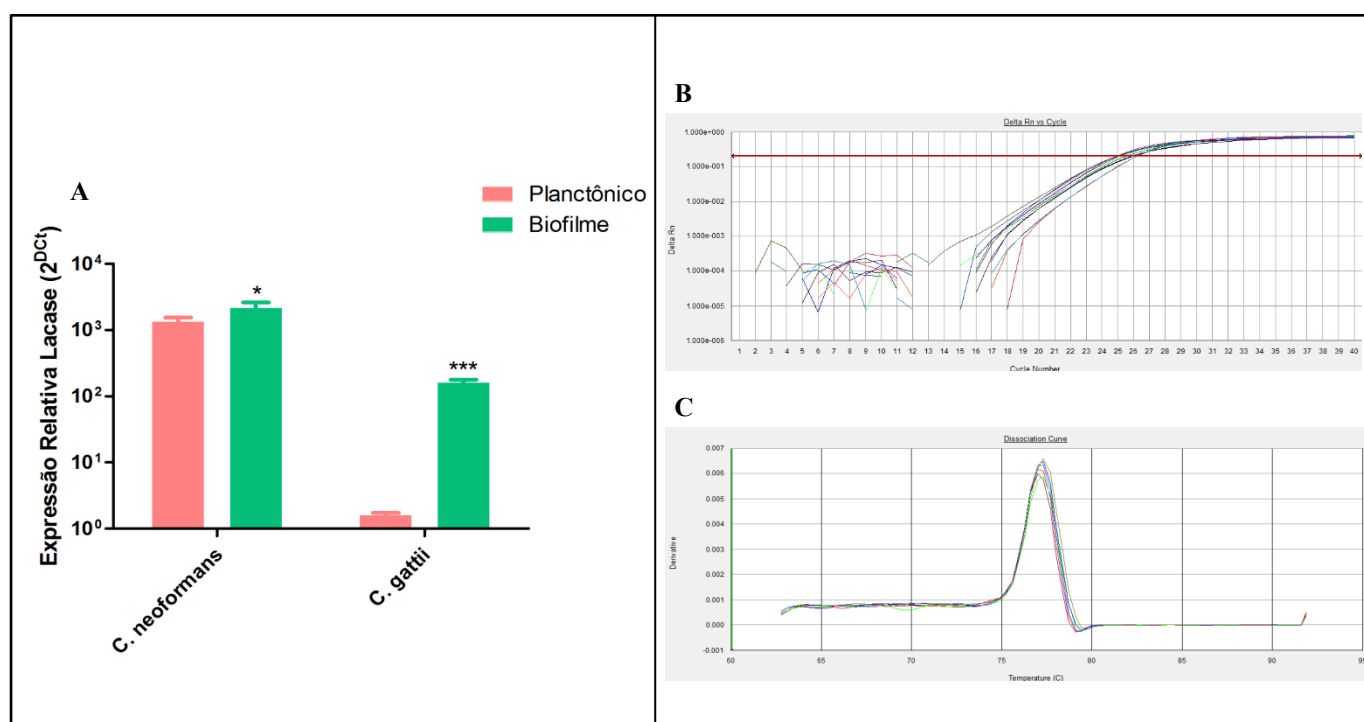
A comparação para as curvas de sobrevivência foi analisada através do teste de Mantel-Cox (A-D). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.8. Expressão gênica de *LAC1*, *URE1* e *CAP59* em biofilmes e células planctônicas de *Cryptococcus* spp.

Para os ensaios de *PCR* em tempo real foi utilizado o gene *GAPDH* como controle interno e os resultados de expressão gênica relativa de *URE1*, *LAC1* e *CAP59* para biofilmes e células planctônicas de *C. neoformans* e *C. gattii* estão apresentados abaixo.

Na condição de biofilme foi observado o aumento da expressão da lacase tanto para *C. neoformans* quanto para *C. gattii* quando comparados com células planctônicas (Figura 34). Essa diferença foi comprovada estatisticamente pelo teste *t* Student (Figura 34), no qual a expressão desse gene foi mais significativa em *C. gattii* ($p<0,001$) que *C. neoformans* ($p<0,05$).

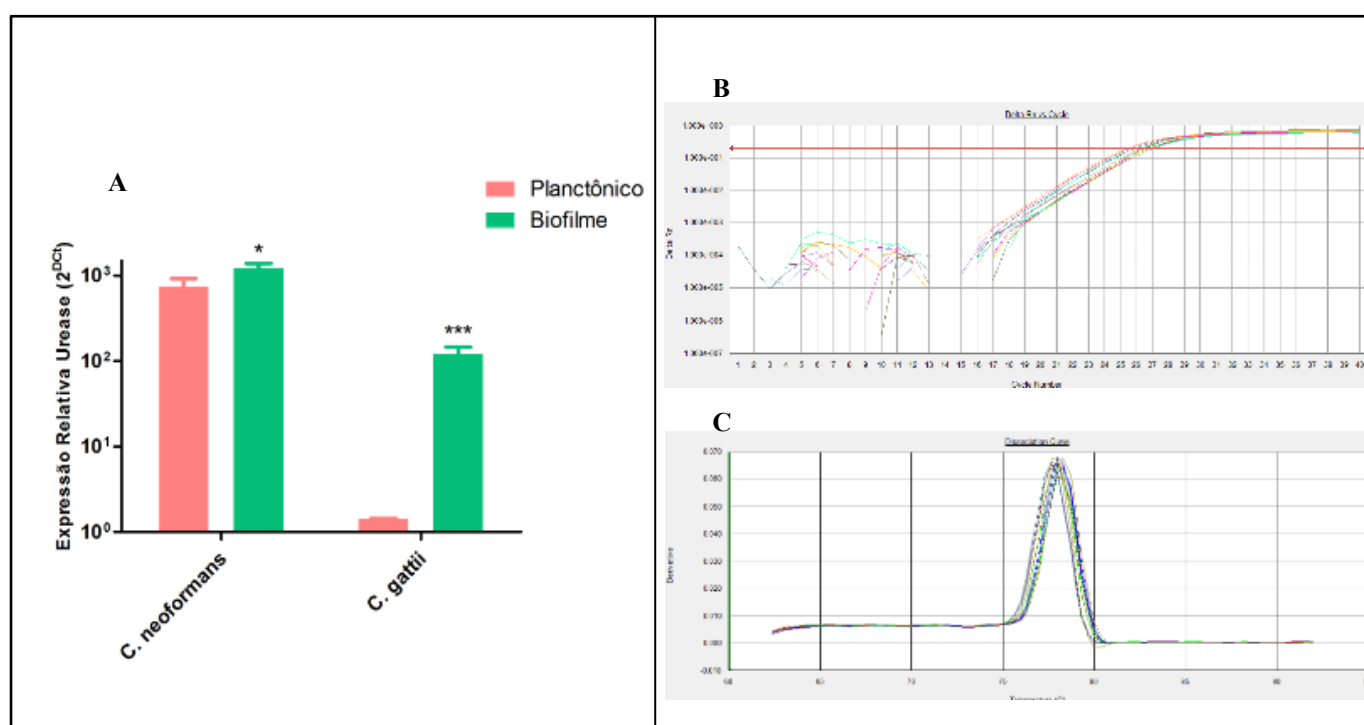
Figura 34. Expressão do gene lacase (*LAC1*) normalizada por *GAPDH* para biofilme e células planctônicas de *C. neoformans* e *C. gattii*.



A- Gráfico da expressão da urease de biofilme e células planctônicas; B – Curva de Amplificação; C- Curva de Dissociação. Os asteriscos indicam o valor *p* de significância. A comparação para as curvas de sobrevivência foi analisada através do teste de Mantel-Cox (A-D). Valores de $p<0,05$ foram considerados significativos. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Na condição de biofilme foi observado o aumento da expressão da urease tanto para *C. neoformans* quanto para *C. gattii* quando comparados com células planctônicas (Figura 35). Essa diferença foi comprovada estatisticamente pelo teste *t* Student (Figura 35), no qual a expressão desse gene foi mais significativa em *C. gattii* ($p<0,001$) que *C. neoformans* ($p<0,05$).

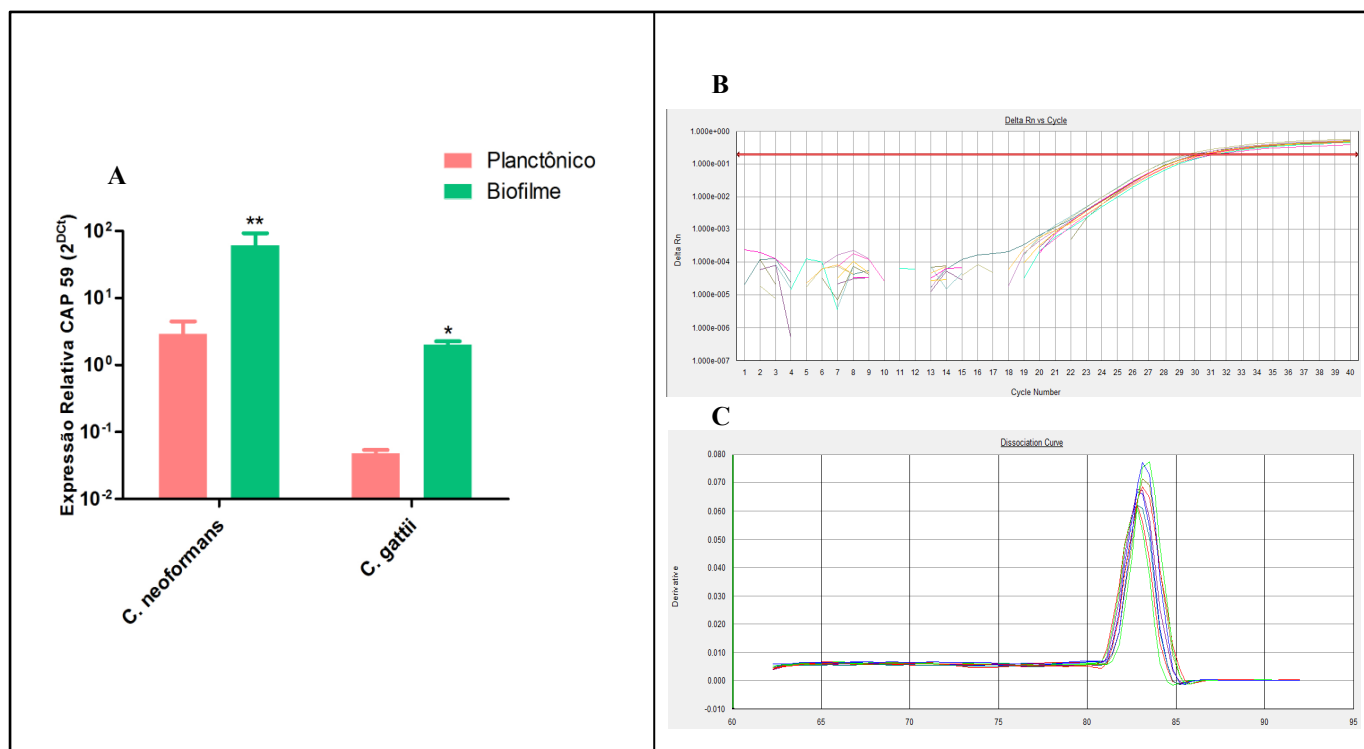
Figura 35. Expressão do gene urease (*URE1*) normalizada por GAPDH para biofilme e células planctônicas de *C. neoformans* e *C. gattii*.



A- Gráfico da expressão da urease de biofilme e células planctônicas; B – Curva de Amplificação; C- Curva de Dissociação. Os asteriscos indicam o valor *p* de significância. A comparação para as curvas de sobrevivência foi analisada através do teste de Mantel-Cox (A-D). Valores de $p<0,05$ foram considerados significativos. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Em biofilmes de *C. neoformans* e *C. gattii* foi observado um aumento na expressão de *CAP59* quando comparados com células planctônicas. (Figura 36). Essa diferença foi comprovada estatisticamente pelo teste *t* Student, no qual a expressão desse gene foi mais significativa em *C. gattii* ($p<0,001$) que *C. neoformans* ($p<0,05$).

Figura 36. Expressão do gene de síntese de cápsula (*CAP59*) normalizada por GAPDH para biofilme e células planctônicas de *C. neoformans* e *C. gattii*.



A- Gráfico da expressão da urease de biofilme e células planctônicas; B – Curva de Amplificação; C- Curva de Dissociação. Os asteriscos indicam o valor p de significância. A comparação para as curvas de sobrevivência foi analisada através do teste de Mantel-Cox (A-D). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os ensaios foram realizados em triplicata.

5. Discussão

A criptococose se destaca como a terceira infecção fúngica sistêmica mais prevalente em todo o mundo e se consideramos os indivíduos imunocomprometidos, essa patologia atinge o primeiro lugar, sendo responsável por mais de 50 % dos casos das infecções fúngicas (PRADO *et al.*, 2009; TORTORANO *et al.*, 2012).

C. neoformans e *C. gattii* são as espécies que se destacam como as principais causadoras de infecções em humanos e são amplamente distribuídas na natureza, principalmente nas excretas e ninhos de aves, folhas, cascas e frutos de árvores (NEGRONI, 2012). Tendo em vista o problema da criptococose no Brasil e na região de Araraquara e Ribeirão Preto como demonstrado nos trabalhos de vários autores (ALMEIDA *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2011), MATSUMOTO *et al.*, 2007 e PEDROSO, FERREIRA *et al.*, 2009), nosso estudo pretendeu verificar a capacidade de isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* formarem biofilmes. Para tanto, foi primeiramente realizada a seleção das amostras de *Cryptococcus* spp. por meio de análises bioquímicas, microscópicas e moleculares de 19 isolados, que foram avaliados quanto aos tipos moleculares das espécies de *C. neoformans* (VNI, VNII, VNIII e VNIV) e de *C. gattii* (VGI, VGII, VGIII e VGIV), sendo 2/19 oriundos de aves, 15/19 procedentes de excretas secas de pombos e 1/19 isolado de paciente. Entre os 19 isolados, duas amostras foram identificadas como *C. gattii* genótipo VGII e 17 como *C. neoformans* genótipo VNI. Vários estudos tanto do Brasil como do exterior têm demonstrado a prevalência dos dois genótipos, respectivamente das duas espécies, conforme achados em nosso trabalho. Andrade-Silva e colaboradores (2010) avaliaram isolados ambientais de *C. neoformans* e *C. laurentii* de áreas externas de hospitais e constataram a presença de *C. neoformans* em 43% das amostras coletadas, 23,3 % de *C. laurentii* e em 10,9 % observaram a presença das duas espécies em uma mesma amostra. Entre os isolados de *C. neoformans*, o tipo molecular que predominou foi o VNI (ANDRADE-SILVA *et al.*, 2010). Matos *et al.*, em 2012 coletaram 62 isolados clínicos de *Cryptococcus* a partir de casos de meningite no período de 2006 a 2010 na Bahia, Brasil; e verificaram que 79% dos isolados foram identificados como *C. neoformans* e 21% *C. gattii*. A avaliação dos genótipos determinou que todos os isolados de *C. gattii* pertenciam ao genótipo VGII, e 98% dos isolados de *C. neoformans* ao genótipo VNI (MATOS *et al.*, 2012). Trilles e colaboradores (2008) verificaram os tipos mais comuns de ocorrência no Brasil e encontraram os seguintes resultados: VNI (64%), VGII (21%), VNII (5%), VGIII (4%), VGI e VNIV (3% cada) e VNIII (< 1%) (TRILLES *et al.*, 2008).

Day e colaboradores (2011) no Vietnã, mostraram que *C. neoformans* var. *grubii* VNI é responsável pela maioria dos casos de meningite criptocócica no país e relatam que esta

espécie foi responsável por 73% dos casos de meningite em pacientes não infectados pelo HIV e por 100% dos casos em pacientes HIV positivos (DAY *et al.*, 2011).

Na cidade de Buenos Aires, Argentina, *C. gattii* genótipo VGI foi encontrado em ocos de madeira em decomposição, em diferentes espécies de árvores (MAZZA *et al.*, 2013). Ferreira e colaboradores, em Portugal, identificaram 28 isolados de *C. neoformans* - cinco de folhas de eucalipto em decomposição e 23 de excretas de pombos domésticos. Os genótipos VNIV (53,6%, n = 15) e VNI (32,1%, n = 9) foram abundantemente presentes entre os isolados ambientais, seguido do híbrido VNIII (14,3%, n = 4) (FERREIRA *et al.*, 2013).

O outro aspecto verificado em nosso trabalho foi em relação à capacidade de *Cryptococcus* spp. formar biofilme. A produção de biofilme por esta levedura tem sido frequentemente descrita como uma estratégia associada à infecção crônica, como um resultado de resistência adquirida aos mecanismos imunológicos do hospedeiro e à terapia antifúngica (MARTINEZ & CASADEVALL, 2006). No presente estudo, todas as amostras foram capazes de formar biofilmes. RPMI 1640 é rico em nutrientes e vitaminas e permite o crescimento e a adesão das leveduras nas placas de poliestireno. Martinez e Casadevall, em 2006 descrevem que fatores como as características do meio e a superfície de fixação são importantes para o desenvolvimento do biofilme de *Cryptococcus* spp. As cepas de *C. neoformans* formaram biofilmes mais densos quando foram cultivadas em meio RPMI 1640 (MARTINEZ e CASADEVALL, 2006b). Estes dados foram confirmados em nosso trabalho, em que por microscopia eletrônica verificou-se a formação de uma rede densa de leveduras evidenciando matriz extracelular auto-produzida unindo as células de *Cryptococcus* spp.

Biofilme é um agregado de células microbianas incorporadas em uma matriz auto produtiva, em superfícies bióticas ou abióticas, visto como um modo de crescimento microbiano que pode fornecer proteção contra ambientes hostis (SUN *et al.*, 2013), atuando como reservatórios para fontes de infecção persistente (RAMAGE e WILLIAMS, 2013).

A formação do biofilme representa a forma mais comum de crescimento dos micro-organismos na natureza, e representam até 65% de todas as infecções clínicas e, dado o alto nível de resistência antimicrobiana que eles provocam, representam um imenso obstáculo à prática clínica (DONLAN e COSTERTON, 2002; RAMAGE e WILLIAMS, 2013). Biofilmes fúngicos constituem um problema clínico crescente associado com altas taxas de mortalidade (WILLIAMS e COSTERTON, 2012). A formação de biofilme é um mecanismo comum, utilizado por microrganismos para sobreviver em ambientes hostis, colonizar e estabelecer-se em um novo ambiente, conferindo proteção contra sua eliminação (HALL-STOODLEY *et al.*,

2004). Ravi et al (2009) descreveram melhores condições para a formação de biofilme criptocócico como: 25-37° C, pH neutro e tensão de CO₂ ambiente (RAVI et al., 2009) .

A quantificação do biofilme de *Cryptococcus* spp. foi realizada *in vitro* e a utilização deste ensaio é explicada por Zhou e colaboradores em 2012, no qual os autores relatam que o ensaio de redução do XTT tem sido amplamente utilizado nos últimos anos. XTT é um novo sal de tetrazólio de coloração amarela que é convertido à formazana corada na presença de atividade metabólica. Uma vez que o produto de formazana é solúvel em água, este pode ser facilmente medido no sobrenadante celular, o que se torna extremamente importante na pesquisa de biofilmes, permitindo o estudo de biofilmes intactos, bem como a realização de testes de sensibilidade a drogas sem o rompimento da estrutura do mesmo. Dessa forma, através da utilização do método espectrofotométrico e o ensaio de redução do XTT neste estudo, foi possível avaliar o crescimento do biofilme fúngico com precisão (ZHOU *et al.*, 2012).

Em nosso trabalho, durante a cinética de formação de biofilmes de *C. neoformans* e *C. gattii* observou-se que as amostras de *C. gattii* apresentaram maior absorbância no tempo inicial de adesão (5h) quando comparadas com outras amostras de *C. neoformans* e permaneceram mais altas até o final da formação do biofilme. Essa diferença, porém, foi discreta, e não significativa estatisticamente. Apesar das amostras 5.1, 21.1 e 21.2 de *C. neoformans* apresentarem uma menor absorbância no tempo inicial de adesão quando comparadas com as amostras de *C. gattii*, esses três isolados de *C. neoformans* tiveram um crescente desenvolvimento na formação do biofilme até 72h, o que foi observado também com as amostras de *C. gattii*. Pessoa e colaboradores, em 2012, analisaram a produção de biofilmes por isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* em Belém, Estado do Pará, Brasil e observaram uma discreta diferença nos resultados com os isolados de *C. gattii* em relação aos resultados obtidos para isolados de *C. neoformans*, quanto à produção de biofilme, mas essa diferença não foi significativa ($p = 0,75$).

Outro aspecto avaliado em nosso trabalho foi avaliar o efeito de anfotericina B e maitenina sobre as células planctônicas e na prevenção da formação de biofilmes, bem como sobre os biofilmes formados. O aumento da CIM às drogas antifúngicas dos isolados de *Cryptococcus* spp. na forma de crescimento em biofilme em comparação às formas planctônicas, aqui descrito, é consistente com estudos anteriores (THÉRAUD *et al.*, 2004; MARTINEZ e CASADEVALL, 2006b; a; DE AGUIAR CORDEIRO *et al.*, 2013). A CIM de AMB não ultrapassou 1,0mg/L entre as células planctônicas de *C. neoformans* e *C. gattii* permanecendo assim dentro do valor de corte VCE que pode variar de 0,5 a 1,0mg/L

(ESPINEL-INGROFF, CHOWDHARY, *et al.*, 2012). Em contrapartida, a faixa de concentração de AMB foi de 2,0 - 8,0mg/L para reduzir aproximadamente 50% da atividade metabólica das células na prevenção da formação dos biofilmes de *C. neoformans* e *C. gattii*; e, em biofilmes maduros destas mesmas leveduras foi preciso o tratamento com 32,0mg/L de AMB para a redução de 50% da atividade metabólica dos mesmos.

Entre as amostras de *C. neoformans*, os isolados 21.1 e 21.2 foram os que precisaram de uma maior concentração de AMB (32mg/L) para reduzir em aproximadamente 50% as atividades metabólicas dos biofilmes formados, seguido pelas amostras EAF e *C. neoformans* ATCC 90112 com 16,0 mg/L de AMB e o isolado 5.1 em que essa redução aconteceu após o tratamento com 8,0 mg/L. A mesma resistência à AMB foi observada para os biofilmes de *C. gattii*. As atividades metabólicas dos biofilmes das amostras CER e *C. gattii* ATCC 56990 foram reduzidas em aproximadamente 50% somente quando biofilmes foram tratados com 32mg/L de AMB.

Estes resultados correlacionam-se com aqueles apresentados na literatura que sugerem que o fenótipo do biofilme confere resistência à terapia medicamentosa antifúngica e podem ser até 1000 vezes mais resistentes a antifúngicos que células planctônicas, segundo relatado por alguns autores, mas a recalcitrância à terapia antimicrobiana ainda tem que ser totalmente elucidada (BACHMANN *et al.*, 2002; MOWAT *et al.*, 2008; TRÉ-HARDY *et al.*, 2008; RAMAGE *et al.*, 2012; RAMAGE e WILLIAMS, 2013).

Apesar de alguns antifúngicos serem eficazes contra fungos em biofilme, particularmente as equinocandinas e formulações de anfotericina B lipossomal, a resistência intrínseca exibida por biofilmes pode ocorrer (RAMAGE *et al.*, 2012). Células planctônicas geralmente dependem de alterações genéticas irreversíveis para manter um fenótipo resistente, ao passo que os biofilmes são capazes de persistir devido a sua presença física e a densidade da população, que proporciona um fenótipo resistente independentemente das alterações genéticas definidas (RAMAGE *et al.*, 2012; RAMAGE e WILLIAMS, 2013). Alguns autores consideram que as limitações difusionais à penetração do antifúngico através do biofilme, podem ser consideradas como um mecanismo de resistência, em que a passagem do antifúngico através das diferentes camadas de células e da matriz polimérica faz com que a concentração que atinge as células mais internas do biofilme seja inferior (NIIMI, FIRTH e CANNON, 2010; RAMAGE *et al.*, 2012). Especificamente, essa resistência pode estar ligada ainda na super-expressão de moléculas-alvo, extrusão ativa da droga através de bombas de e-fluxo, tolerância

e densidade das células. Estes mecanismos são utilizados pelos fungos para circunscrever os efeitos do tratamento antifúngico (NIIMI, FIRTH e CANNON, 2010; RAMAGE *et al.*, 2012).

A AMB convencional, um polieno de amplo espectro, tem sido um dos pilares do tratamento de infecções fúngicas invasivas como a criptococose, mas está associada a efeitos adversos em 50-90% dos casos, incluindo reações relacionadas à infusão, desequilíbrio eletrolítico, e nefrotoxicidade (CLEMENTS e PEACOCK, 1990; ENOCH, LUDLAM e BROWN, 2006; WADE *et al.*, 2013). As formulações lipídicas de anfotericina B, incluindo AMB lipossomal (L-AMB) e complexo lipídico de AMB (ABLC), têm demonstrado equivalente eficácia e toxicidade reduzida em comparação com AMB convencional, embora ensaios clínicos revelassem que a L-AMB e ABLC não forneceram evidências definitivas que avaliassem as diferenças de nefrotoxicidade entre as formulações (SAFDAR *et al.*, 2010; WADE *et al.*, 2013).

Tendo em vista as complicações no tratamento da criptococose com AMB, e a dificuldade do tratamento de biofilmes, o estudo com plantas e suas substâncias, como compostos antifúngicos inovadores vem apresentando destaque nos últimos anos. Há muito tempo, as plantas vêm sendo amplamente utilizadas na medicina popular, pois representam uma alternativa econômica, de fácil obtenção, apresentam aplicabilidade a diversas doenças e baixa toxicidade ao homem (GULLO *et al.*, 2012; SARDI *et al.*, 2012).

Neste trabalho foi estudada a substância maitenina, isolada da planta *Maytenus ilicifolia*, buscando uma ação antifúngica efetiva contra biofilmes de *Cryptococcus* spp. A CIM de maitenina ficou na faixa de 0,50-4,00mg/L entre as células planctônicas de *C. neoformans* e *C. gattii*. A concentração de maitenina foi de 4,00-8,00mg/L para reduzir aproximadamente 50% da atividade metabólica das células na prevenção da formação dos biofilmes de *C. neoformans* e *C. gattii*; e em biofilmes maduros destas mesmas leveduras foi preciso o tratamento com 32,0 mg/L de maitenina para a redução de 50% da atividade metabólica dos mesmos (mesma concentração encontrada para AMB).

Biofilmes de *C. neoformans* e *C. gattii* foram também tratados com maitenina. As atividades metabólicas dos biofilmes dos isolados 21.2, EAF e 5.1 de *C. neoformans* foram reduzidas em aproximadamente 50% quando esses biofilmes foram tratados respectivamente com 32 mg/L, 16 mg/L e 8 mg/L de maitenina, respectivamente. Quando comparamos os resultados de maitenina com os obtidos após o tratamento dos mesmos isolados com AMB, observamos que o antifúngico natural foi capaz de inibir o biofilme nas mesmas proporções que o antifúngico comercial. O mesmo aconteceu com o biofilme do isolado CER de *C. gattii*

que teve sua atividade metabólica reduzida em aproximadamente 50% após tratamento com 32mg/L de maitenina. Já para o isolado 21.1 e a cepa *C. neoformans* ATCC 90112, o tratamento com 16 mg/L e 8 mg/L de maitenina, respectivamente, foram suficientes para reduzir em aproximadamente 50% a atividade metabólica dos biofilmes, enquanto que a concentração de AMB foi de 32 mg/L e 16 mg/L, respectivamente. A atividade metabólica do biofilme de *C. gattii* ATCC 56990 foi reduzida em aproximadamente 50% quando tratado com 16 mg/L de maitenina contra 32mg/L de AMB. Assim, aparentemente a maitenina teve comportamento bastante semelhante à AMB.

Ambas as drogas mediarão uma redução significativa na atividade metabólica das células de *Cryptococcus* spp., consistente com as suas propriedades fungicidas, observadas na contagem de UFC/mL uma vez que não houve células sobreviventes após o tratamento do biofilme com 64,00mg/L de maitenina e AMB. No entanto, Gullo e colaboradores em 2012 observaram pelo ensaio de citotoxicidade para a linhagem celular de NOK mais de 80% da viabilidade celular na concentração de 64,00mg/L de maitenina (Gullo *et al.*, 2012). Nossos resultados sugerem que a maitenina poderia ser uma nova opção para a prevenção ou tratamento de biofilmes de *Cryptococcus* spp. Na literatura poucos relatos podem ser encontrados de novos agentes antifúngicos que possam ser utilizados como alternativa aos antifúngicos comerciais para biofilmes de *Cryptococcus* spp. De Aguiar Cordeiro e colaboradores em 2013 avaliaram o efeito inibitório de combinações de sulfametoxazol-trimetoprim (SMX/TMP) e sulfadiazina-pirimetamina (SDZ/PIR) contra biofilmes de *C. neoformans* e *C. gattii*. Foram testadas duas concentrações para cada combinação, sendo (SMX/TMP): [5000 mg/L - 1000 mg/L] e [2000 mg/L - 400 mg/L] e (SDZ/PIR): [5000 mg/L - 250 mg/L] e [2000 mg/L - 100 mg/L]. As combinações de fármacos SMX/TMP e SDZ/PIR foram capazes de impedir a formação de biofilme e mostrou efeito inibitório contra biofilmes maduros de ambas as espécies (DE AGUIAR CORDEIRO *et al.*, 2013). Martinez e colaboradores em 2010 avaliaram a atividade de quitosana, um biopolímero hidrófilo obtido industrialmente de crustáceo, em biofilmes formados e em formação de *C. neoformans*, e constataram que essa substância natural pode ser uma opção na prevenção ou tratamento de biofilmes de *C. neoformans* (MARTINEZ *et al.*, 2010).

Assim, neste estudo, foram também avaliadas as diferenças na expressão gênica de *C. neoformans* e *C. gattii* no modo biofilme e no modo planctônico e ainda analisada a virulência das espécies de *Cryptococcus* utilizando o modelo *Galleria mellonella* em células planctônicas e células que passaram por formação de biofilme. Virulência é resultado da interação de um

micróbios e um hospedeiro e é um fenótipo complexo que depende de inúmeros fatores apresentados tanto pelo micro-organismo, como pelo hospedeiro (CASADEVALL e PIROFSKI, 2001; GARCIA-SOLACHE *et al.*, 2013). O uso de hospedeiros invertebrados para estudar a virulência microbiana de patógenos apresenta vantagens sobre os mamíferos convencionais. Amebas, nematóides e insetos hospedeiros são bons modelos para estudar virulência e para elucidar a interação patógeno-hospedeiro (STEENBERGEN, SHUMAN e CASADEVALL, 2001; MYLONAKIS *et al.*, 2002; STEENBERGEN *et al.*, 2003; ALARCO *et al.*, 2004; GLAVIS-BLOOM, MUHAMMED e MYLONAKIS, 2012; SCORZONI *et al.*, 2013).

Durante a evolução, os animais não vertebrados têm imunidade desenvolvida contra patógenos microbianos (FUCHS e MYLONAKIS, 2006), e por esta razão, há semelhanças estruturais e funcionais entre o sistema imune inato dos mamíferos e insetos. Assim, estes modelos podem ser utilizados para estudar as respostas imunitárias (SCORZONI *et al.*, 2013). A ação de drogas antifúngicas é uma combinação entre o mecanismo de ação da droga e a resposta do hospedeiro (BEN-AMI, LEWIS e KONTOYIANNIS, 2008; ROMANI, 2011; SCORZONI *et al.*, 2013). Estudos sobre os mecanismos de interação fungo-hospedeiro são de suma importância para a melhor compreensão dessa interação, e, portanto, são necessários estudos *in vivo*. Entre os modelos alternativos para estudo da interação patógeno-hospedeiro, bem como da ação e toxicidade de novos antifúngicos de forma simples e em grande escala, o modelo com *G. mellonella* tem sido empregado.

O estudo da virulência de diferentes fungos tem sido realizado em *G. mellonella* com sucesso, devido ao seu fácil manuseio, tornando um modelo desejável para o estudo da patogenicidade (FUCHS *et al.*, 2010). *G. mellonella* tem mostrado fornecer uma visão útil na patogênese de uma grande variedade de infecções microbianas, incluindo fungos (*Fusarium oxysporum*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*) e agentes patogênicos bacterianos, tais como *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* e *Enterococcus faecalis* (RAMARAO, NIELSEN-LEROUX e LERECLUS, 2012).

Em *C. neoformans* o fenótipo de aumento capsular também conhecido por células gigantes, encontrado quando essa levedura infecta mamíferos também foi observado em *G. mellonella* (GARCÍA-RODAS *et al.*, 2011). Scorzoni e colaboradores (2013) analisaram organismos não mamíferos como o lepidóptero *G. mellonella* e o nemátodo

Caenorhabditis elegans, como modelos viáveis para estudar a virulência do fungo e eficácia de drogas antifúngicas durante a infecção por *Candida krusei* (SCORZONI *et al.*, 2013).

Em nossos estudos realizaram-se curvas de sobrevivência com diferentes concentrações fúngicas das amostras de *C. neoformans* e *C. gattii*. Como resultado observou-se que a morte de *G. mellonella* é dependente da concentração fúngica aplicada. A concentração selecionada para os experimentos posteriores foi 5×10^6 UFC/larva porque com essa dose foi possível verificar que a morte foi progressiva, não ocorrendo apenas nos últimos dias do experimento.

No experimento de ensaio de sobrevivência com *G. mellonella* foi observado que as larvas que foram infectadas com as células de *C. neoformans* e *C. gattii*, que passaram pelo processo de formação de biofilme, não sobreviveram após o quarto dia da infecção e foram mais virulentas que as células que não passaram por esse processo. Wand e colaboradores, em 2012 observaram que biofilmes de *Acinetobacter baumannii* foram capazes de produzir taxas de mortalidade mais elevadas quando comparadas com células planctônicas de vários isolados clínicos avaliados em modelos de cultura de biofilme testados para a virulência no modelo de *G. mellonella*. Em ambos os sistemas, os perfis mostraram diferenças significativas entre as cepas. Em relação a culturas de células planctônicas e biofilme de *A. baumannii* também mostraram reduzida sensibilidade aos antibióticos habitualmente utilizados no tratamento de *A. baumannii* (WAND *et al.*, 2012). Cirasola e colaboradores em 2013 avaliaram a virulência de isolados clínicos de *C. albicans* com ou sem capacidade de formação de biofilme observando a sobrevivência de larvas de *G. mellonella* após a infecção e constataram que em isolados que tinham a capacidade de formação de biofilme a taxa de sobrevivência das larvas era menor, onde 80% das larvas infectadas morreram dentro de 72 horas (CIRASOLA *et al.*, 2013).

Nossos estudos revelaram que de maneira inédita em *Cryptococcus*, células desta levedura que passaram pelo processo de formação de biofilme foram mais virulentas que as células que não passaram pela mesma situação quando analisados no modelo de *G. mellonella*. Outros fatores de virulência poderiam estar associados durante a formação do biofilme e ajudariam a entender a patogenicidade na infecção de *G. mellonella*.

Desde o início da era da AIDS, vários fatores de virulência foram identificados utilizando *C. neoformans* como modelo (PERFECT, 2005). A produção de melanina (WILLIAMSON, 1994), presença de cápsula (CHANG e KWON-CHUNG, 1994), crescimento a 37°C (KRAUS *et al.*, 2003), mating type alfa (KWON-CHUNG, EDMAN e WICKES, 1992), produção de fosfolipase (WRIGHT *et al.*, 2004), superóxido dismutase (COX

et al., 2003), proteínas quinase (ALSPAUGH, Perfect e HEITMAN, 1998), a urease (COX *et al.*, 2000) foram caracterizadas fenotipicamente e molecularmente como fatores de virulência relacionados à invasão e sobrevivência no hospedeiro *in vivo* (PERFECT, 2005). Poucos estudos foram realizados em *C. gattii* e, portanto, os genes que regulam a sua virulência foram inferidos a partir do trabalho em *C. neoformans*. Algumas evidências de diferenças na regulação dos genes de virulência entre as duas espécies foram publicadas (HICKS e HEITMAN, 2007; NGAMSKULRUNGROJ *et al.*, 2009). Têm sido relatados que para a formação da cápsula de *C. neoformans* são necessários quatro genes *CAP59*, *CAP64*, *CAP60* e *CAP10* (CHANG, PENOYER e KWON-CHUNG, 1996; GRIJPSTRA *et al.*, 2009). No entanto, homólogos de *CAP10*, *CAP59* e *CAP64* foram encontrados em outros fungos não encapsulados, sugerindo que estes genes podem estar envolvidos na síntese de outros processos (GARCÍA-RIVERA *et al.*, 2004). *CAP59* foi o primeiro gene de cápsula encontrado diretamente relacionado com o fenótipo da cápsula e virulência (CHANG e KWON-CHUNG, 1994; CHANG, WICKES e KWON-CHUNG, 1995) e que está presente em todas as variedades de *C. neoformans* (ALSPAUGH, PERFECT e HEITMAN, 1998). Nossos resultados demonstraram aumento da expressão do gene *CAP59* em biofilmes de *C. neoformans* e *C. gattii*. Embora não haja estudos desse gene ainda descrito em biofilmes, a importância do aumento da expressão poderia estar relacionada com a virulência e resistência, uma vez que a presença da cápsula evitaria a ação dos fagócitos e também a ação de drogas antifúngicas. Del Poeta (2004) sugeriu que as alterações na estrutura da cápsula poderiam estar relacionadas com respostas às condições ambientais específicas, com implicações importantes para a resposta imune do hospedeiro (DEL POETA, 2004). Assim sendo, a formação do biofilme é uma condição diferenciada do crescimento planctônico e isso estaria de acordo com a literatura.

Nossos resultados demonstraram um aumento da expressão de lacase para biofilmes de *C. neoformans* e *C. gattii* quando comparados com células planctônicas. A lacase, uma enzima fenoloxidase, foi descrita por Zhu e colaboradores em 2001, como sendo um importante fator de virulência colaborando para a proteção do fungo contra danos oxidativos causados por fagócitos no hospedeiro, localizado na parede celular de *C. neoformans* (ZHU *et al.*, 2001). A enzima foi também descrita para a espécie *C. gattii* (SORRELL, 2001), podendo ainda modular a resposta imune e contribuir para a disseminação da doença para o SNC (QIU *et al.*, 2012).

O gene *LAC1* está envolvido com a produção de melanina, um pigmento que garante às leveduras do gênero *Cryptococcus* um mecanismo de adaptação a condições ambientais e de proteção contra a radiação UV (MAUCH, CUNHA e DIAS, 2013). Nossos resultados

demonstraram uma maior expressão do gene *LAC1* do isolado de *C. neoformans* do que em *C. gattii*. Isso pode ser devido ao fato do isolado de *C. neoformans* ser ambiental e o isolado *C. gattii* ser clínico. Pereira e colaboradores observaram diferenças após a análise da enzima lacase, por quantificação da intensidade de melanina produzida por cepas clínicas e ambientais de *C. neoformans* e *C. gattii*. Mais da metade dos isolados clínicos (56,2%) apresentaram as menores intensidades de melanina, sugerindo que a produção de melanina pode não ser o principal fator de virulência contra a defesa do hospedeiro. Os isolados ambientais apresentaram os maiores valores de intensidade de melanina, o que pode estar relacionado com uma exposição anterior a condições de estresse ambiental (PEREIRA *et al.*, 2009).

A urease é uma metaloenzima que catalisa a hidrólise da uréia em amônia e carbamato, que em condições fisiológicas, aumenta o pH. Cox e colaboradores descreveram a importância dessa enzima como fator de virulência nas bactérias *Helicobacter pylori*, *Proteus mirabilis*, e, nos fungos de importância clínica *C. neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* e espécies de *Trichosporon* e *Aspergillus* (COX *et al.*, 2000). Nossos resultados demonstraram que na condição de biofilme foi observado o aumento da expressão da urease tanto para *C. neoformans* quanto para *C. gattii* quando comparados com células planctônicas. Morrow e Fraser em 2013 descrevem que a urease pode promover a transmigração do fungo à barreira hemato-encefálica e facilitar a invasão do sistema nervoso central, demonstrando que a atividade da urease pode afetar diretamente a interação do fungo com as células endoteliais e os microcapilares cerebrais da barreira hemato-encefálica (Morrow e Fraser, 2013). Cox e colaboradores sugeriram que a atividade da urease, em modelos murinos, aumenta a sobrevivência dos camundongos infectados com o mutante urease negativa.

Nós verificamos ainda que houve uma maior expressão de *URE1* pelo isolado de *C. neoformans* em relação ao de *C. gattii*. O mesmo foi encontrado por Torres-Rodríguez e colaboradores que observaram diferenças quantitativas na produção de urease entre as duas espécies e *C. neoformans* apareceu como o maior produtor de urease (TORRES-RODRÍGUEZ, ALVARADO-RAMÍREZ e GUTIÉRREZ-GALLEGO, 2008). Vários isolados de *C. gattii* sorotipo B que demonstraram ser altamente patogênicos em modelo experimental de criptococose em camundongos imunocompetentes foram estudados por Torres-Rodríguez e colaboradores em 2003. Esses mesmos isolados tinham baixo nível de atividade da urease, sugerindo, que a atividade de outras enzimas, bem como vários outros fatores de virulência teriam um papel fundamental na virulência desta espécie (TORRES-RODRÍGUEZ *et al.*, 2003). Embora, sem dúvida, a urease tenha um papel importante na patogenicidade de ambas

as espécies de *Cryptococcus*, é muito provável que seja o efeito de vários fatores combinados que determinam a virulência de *C. gattii*. Outros fatores de virulência também devem ser investigados para explicar a patogenicidade de *C. gattii*.

Nossos resultados demonstraram uma maior expressão dos genes *CAP59*, *LAC1* e *URE1* de *C. neoformans* e *C. gattii* na situação de biofilme em comparação com o modo planctônico, sugerindo que estes genes possam estar relacionados com o biofilme e podem estar envolvidos com a maior virulência encontrada no modelo de *G. mellonella*, embora a virulência não possa ser considerada como um fator isolado; e que virulência é uma propriedade emergente importante porque implica em diversas situações, como a temperatura (Garcia-Solache *et al.*, 2013), taxa de CO₂ e limitação de ferro (VARTIVARIAN *et al.*, 1993) apud (ZARAGOZA e PEMÁN, 2012) e conseqüentemente, este fenômeno precisa ser estudado por uma abordagem mais holística.

Para os genes *LAC1* e *URE1* houve diferença estatística em ambas as situações, biofilme e planctônico, comprovadas pelo teste *t* Student, no qual *C. gattii* apresentou maior diferença na expressão desses genes ($p < 0,001$) que *C. neoformans* ($p < 0,05$), sugerindo que *C. gattii* exibe fatores de virulência que contribuiriam para que *C. gattii* apresente fenótipo de patógeno primário e, portanto, mais virulento e que a forma de biofilme poderia explicar essa condição. Já para o gene *CAP59* os dados de sua expressão foram mais significativos em *C. neoformans* ($p < 0,01$) que *C. gattii* ($p < 0,05$). Nossos resultados estatísticos corroboram a literatura. Fonseca e colaboradores, em 2010, verificaram que moléculas de polissacarídeo (GXM) com os maiores diâmetros são encontrados em espécies de sorotipos A e D (*C. neoformans*) e que as espécies de sorotipo B (*C. gattii*) apresentaram menores diâmetros de cápsula, apesar de manifestarem uma capacidade potencialmente aprimorada para ativar alguns mecanismos da resposta imunitária do hospedeiro (FONSECA *et al.*, 2010).

Desta maneira, este trabalho contribuiu para o melhor entendimento dos agentes da criptococose quanto aos aspectos da interação levedura-hospedeiro-antifúngico.

6. Conclusões

- a) Todos os isolados de *Cryptococcus* spp. advindos de fontes ambientais, bem como de outras fontes foram capazes de formar biofilmes e a microscopia eletrônica evidenciou a formação de uma rede densa de leveduras unidas por uma matriz extracelular auto-produzida. Durante a cinética de formação de biofilmes observou-se que os isolados de *C. gattii* apresentaram maior absorbância no tempo inicial de adesão (5h) quando comparados com outros isolados de *C. neoformans*, porém não significante estatisticamente.
- b) A maitenina teve comportamento bastante semelhante à AMB quanto as CIMs na forma planctônica e de biofilme e por apresentar baixa toxicidade mesmo nas concentrações de 32,00 mg/L, como evidenciado em testes de citotoxicidade, sugere-se que esta poderia ser uma nova opção para a prevenção ou tratamento de biofilmes de *Cryptococcus* spp.
- c) Verificou-se que células de *C. neoformans* e *C. gattii* que passaram pelo processo de formação de biofilme foram mais virulentas que as células que não passaram pela mesma situação quando analisados no modelo de *G. mellonella*.
- d) Biofilmes de *C. neoformans* e *C. gattii* demonstraram uma maior expressão dos genes *CAP59*, *LAC1* e *URE1* em comparação com o modo planctônico, sugerindo que esta forma de apresentação possa estar envolvida com a maior virulência encontrada no modelo de *G. mellonella*.
- e) Para os genes *LAC1* e *URE1*, *C. gattii* apresentou níveis mais elevados de expressão ($p < 0,001$) que *C. neoformans* ($p < 0,05$), sugerindo que *C. gattii* teria mais condições de estar na forma de biofilme e exibir fatores de virulência que poderiam contribuir para seu fenótipo de patógeno primário mais virulento.
- f) Os dados apresentados demonstram que a virulência e resistência em biofilmes de *C. neoformans* e *C. gattii* são aumentadas.

7. Referências

ALARCO, A. M. et al. Immune-deficient *Drosophila melanogaster*: a model for the innate immune response to human fungal pathogens. **J Immunol**, v. 172, n. 9, p. 5622-8, May 2004. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15100306> >.

ALBUQUERQUE, P.; CASADEVALL, A. Quorum sensing in fungi--a review. **Med Mycol**, v. 50, n. 4, p. 337-45, May 2012. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22268493> >.

ALHAJI, M.; SADIKOT, R. T. Cryptococcal endocarditis. **South Med J**, v. 104, n. 5, p. 363-4, May 2011. ISSN 1541-8243. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21606721> >.

ALMEIDA, A. M. et al. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical sequential isolates of *Cryptococcus neoformans* from Sao Paulo State, Brazil. **FEMS Yeast Res**, v. 7, n. 1, p. 152-64, Jan 2007. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17311593> >.

ALSPAUGH, J. A.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J. Signal transduction pathways regulating differentiation and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. **Fungal Genet Biol**, v. 25, n. 1, p. 1-14, Oct 1998. ISSN 1087-1845. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9806801> >.

ANDRADE-SILVA, L. et al. Susceptibility profile of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Med Mycol**, Jan 2013. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23343452> >.

_____. Molecular characterization and evaluation of virulence factors of *Cryptococcus laurentii* and *Cryptococcus neoformans* strains isolated from external hospital areas. **Fungal Biol**, v. 114, n. 5-6, p. 438-45, 2010 May-Jun 2010. ISSN 1878-6146. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20943154> >.

ANTACHOPOULOS, C.; WALSH, T. J. Immunotherapy of *Cryptococcus* infections. **Clin Microbiol Infect**, v. 18, n. 2, p. 126-33, Feb 2012. ISSN 1469-0691. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22264261> >.

BACH, M. C.; TALLY, P. W.; GODOFSKY, E. W. Use of cerebrospinal fluid shunts in patients having acquired immunodeficiency syndrome with cryptococcal meningitis and uncontrollable intracranial hypertension. **Neurosurgery**, v. 41, n. 6, p. 1280-2; discussion 1282-3, Dec 1997. ISSN 0148-396X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9402579> >.

BACHMANN, S. P. et al. In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 11, p. 3591-6, Nov 2002. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12384370> >.

BAJWA, S.; KULSHRESTHA, A. Fungal infections in intensive care unit: challenges in diagnosis and management. **Ann Med Health Sci Res**, v. 3, n. 2, p. 238-44, Apr 2013. ISSN 2141-9248. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23919197> >.

BANERJEE, P. et al. *Cryptococcus laurentii* fungemia. **Indian J Med Microbiol**, v. 31, n. 1, p. 75-7, 2013 Jan-Mar 2013. ISSN 1998-3646. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23508435> >.

BANERJEE, U.; GUPTA, K.; VENUGOPAL, P. A case of prosthetic valve endocarditis caused by *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. **J Med Vet Mycol**, v. 35, n. 2, p. 139-41, 1997 Mar-Apr 1997. ISSN 0268-1218. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9147274> >.

BEN-AMI, R.; LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. P. Immunocompromised hosts: immunopharmacology of modern antifungals. **Clin Infect Dis**, v. 47, n. 2, p. 226-35, Jul 2008. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18540822> >.

BENHAM, R. W. Cryptococcosis and blastomycosis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 50, n. 10, p. 1299-1314, Sep 1950. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14783320> >.

BENNETT, J. E. et al. A comparison of amphotericin B alone and combined with flucytosine in the treatment of cryptococcal meningitis. **N Engl J Med**, v. 301, n. 3, p. 126-31, Jul 1979. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/449951> >.

BHUYAN, P. et al. Cryptococcal lymphadenitis in HIV: a chance diagnosis by FNAC. **Diagn Cytopathol**, v. 41, n. 5, p. 456-8, May 2013. ISSN 1097-0339. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22508523> >.

BRATTON, E. W. et al. Approaches to antifungal therapies and their effectiveness among patients with cryptococcosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 6, p. 2485-95, Jun 2013. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23478968> >.

BRAUN, D. K. et al. Cryptococcal infection of a prosthetic dialysis fistula. **Am J Kidney Dis**, v. 24, n. 5, p. 864-7, Nov 1994. ISSN 0272-6386. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7977331> >.

BRIZENDINE, K. D.; BADDLEY, J. W.; PAPPAS, P. G. Pulmonary cryptococcosis. **Semin Respir Crit Care Med**, v. 32, n. 6, p. 727-34, Dec 2011. ISSN 1098-9048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22167400> >.

BRYAN, R. A. et al. Radioimmunotherapy is more effective than antifungal treatment in experimental cryptococcal infection. **J Infect Dis**, v. 202, n. 4, p. 633-7, Aug 2010. ISSN 1537-6613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20594103> >.

BYRNES, E. J. et al. Molecular evidence that the range of the Vancouver Island outbreak of *Cryptococcus gattii* infection has expanded into the Pacific Northwest in the United States. **J Infect Dis**, v. 199, n. 7, p. 1081-6, Apr 2009. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19220140> >.

_____. Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 4, p. e1000850, Apr 2010. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20421942> >.

_____. A diverse population of *Cryptococcus gattii* molecular type VGIII in southern Californian HIV/AIDS patients. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 9, p. e1002205, Sep 2011. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21909264> >.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. **J Infect Dis**, v. 184, n. 3, p. 337-44, Aug 2001. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11443560> >.

CHAI, S. M.; TEOH, S. C. Ocular cryptococcosis as a presenting manifestation of cryptococcal meningitis in a patient with HIV. **Int J STD AIDS**, v. 23, n. 5, p. 377-8, May 2012. ISSN 1758-1052. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22648900> >.

CHANDRA, J. et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **J Bacteriol**, v. 183, n. 18, p. 5385-94, Sep 2001. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11514524> >.

CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. **Mol Cell Biol**, v. 14, n. 7, p. 4912-9, Jul 1994. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8007987> >.

CHANG, Y. C.; PENOYER, L. A.; KWON-CHUNG, K. J. The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans*, CAP64, is essential for virulence. **Infect Immun**, v. 64, n. 6, p.

1977-83, Jun 1996. ISSN 0019-9567. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8675296>>.

CHANG, Y. C.; WICKES, B. L.; KWON-CHUNG, K. J. Further analysis of the CAP59 locus of *Cryptococcus neoformans*: structure defined by forced expression and description of a new ribosomal protein-encoding gene. **Gene**, v. 167, n. 1-2, p. 179-83, Dec 1995. ISSN 0378-1119. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8566774>>.

CHATURVEDI, A. K. et al. Identification and characterization of *Cryptococcus neoformans* protein fractions that induce protective immune responses. **Proteomics**, v. 13, n. 23-24, p. 3429-41, Dec 2013. ISSN 1615-9861. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24170628>>.

CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S. *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen. **Trends Microbiol**, v. 19, n. 11, p. 564-71, Nov 2011. ISSN 1878-4380. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21880492>>.

CHOWDHARY, A. 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**, v. 60, n. Pt 7, p. 961-7, Jul 2011. ISSN 1473-5644. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21393452>>.

_____. Environmental prevalence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in India: an update. **Crit Rev Microbiol**, v. 38, n. 1, p. 1-16, Feb 2012. ISSN 1549-7828. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22133016>>.

CIRASOLA, D. et al. Experimental biofilm-related *Candida* infections. **Future Microbiol**, v. 8, n. 6, p. 799-805, Jun 2013. ISSN 1746-0921. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23701334>>.

CLEMENTS, J. S.; PEACOCK, J. E. Amphotericin B revisited: reassessment of toxicity. **Am J Med**, v. 88, n. 5N, p. 22N-27N, May 1990. ISSN 0002-9343. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2368770>>.

CLEVELAND, K. O.; GELFAND, M. S.; RAO, V. Posaconazole as successful treatment for fungemia due to *Cryptococcus albidos* in a liver transplant recipient. **QJM**, v. 106, n. 4, p. 361-2, Apr 2013. ISSN 1460-2393. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22843711>>.

COLOMBO, T. E. et al. Identification of fungal diseases at necropsy. **Pathol Res Pract**, v. 208, n. 9, p. 549-52, Sep 2012. ISSN 1618-0631. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22840384> >.

CORDERO, R. J. et al. Chronological aging is associated with biophysical and chemical changes in the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 79, n. 12, p. 4990-5000, Dec 2011. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21968999> >.

COSTERTON, J. W. et al. Microbial biofilms. **Annu Rev Microbiol**, v. 49, p. 711-45, 1995. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8561477> >.

COX, G. M. et al. Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. **Infect Immun**, v. 71, n. 1, p. 173-80, Jan 2003. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12496163> >.

_____. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infect Immun**, v. 68, n. 2, p. 443-8, Feb 2000. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10639402> >.

CUÉLLAR-CRUZ, M. et al. The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by *Candida* species: a review. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 31, n. 10, p. 2513-27, Oct 2012. ISSN 1435-4373. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22581304> >.

DA SILVA, A. C. et al. Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 6305-16, 2012. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23442885> >.

DAY, J. N. et al. Most cases of cryptococcal meningitis in HIV-uninfected patients in Vietnam are due to a distinct amplified fragment length polymorphism-defined cluster of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VN1. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 2, p. 658-64, Feb 2011. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21159929> >.

DE AGUIAR CORDEIRO, R. et al. Antifolates inhibit *Cryptococcus* biofilms and enhance susceptibility of planktonic cells to amphotericin B. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, Nov 2012. ISSN 1435-4373. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23192488> >.

_____. Antifolates inhibit *Cryptococcus* biofilms and enhance susceptibility of planktonic cells to amphotericin B. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 32, n. 4, p. 557-64, Apr 2013. ISSN 1435-4373. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23192488> >.

DE LEÓN, L.; LÓPEZ, M. R.; MOUJIR, L. Antibacterial properties of zeylasterone, a triterpenoid isolated from *Maytenus blepharodes*, against *Staphylococcus aureus*. **Microbiol Res**, v. 165, n. 8, p. 617-26, Oct 2010. ISSN 1618-0623. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20116223> >.

DEL POETA, M. Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 5, p. 1067-75, Oct 2004. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15470235> >.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev**, v. 15, n. 2, p. 167-93, Apr 2002. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11932229> >.

DOS SANTOS, V. A. et al. Evaluation of antioxidant capacity and synergistic associations of quinonemethide triterpenes and phenolic substances from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 6956-73, 2010. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20938406> >.

_____. Antiprotozoal activity of quinonemethide triterpenes from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 1053-62, 2013. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23322069> >.

DROMER, F. et al. Determinants of disease presentation and outcome during cryptococcosis: the CryptoA/D study. **PLoS Med**, v. 4, n. 2, p. e21, Feb 2007. ISSN 1549-1676. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17284154> >.

DUARTE, M. C. et al. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **J Ethnopharmacol**, v. 97, n. 2, p. 305-11, Feb 2005. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15707770> >.

ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 7, p. 1642-4, Jul 1990. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2199524> >.

ELLS, T. C.; TRUELSTRUP HANSEN, L. Strain and growth temperature influence *Listeria* spp. attachment to intact and cut cabbage. **Int J Food Microbiol**, v. 111, n. 1, p. 34-42, Aug 2006. ISSN 0168-1605. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16824634> >.

ENOCH, D. A.; LUDLAM, H. A.; BROWN, N. M. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. **J Med Microbiol**, v. 55, n. Pt 7, p. 809-18, Jul 2006. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16772406> >.

ESCANDÓN, P. et al. Cryptococcosis in Colombia: Results of the national surveillance program for the years 2006-2010. **Biomedica**, v. 32, n. 3, p. 386-98, Sep 2012. ISSN 0120-4157. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23715187> >.

ESPINEL-INGROFF, A. 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**, v. 56, n. 11, p. 5898-906, Nov 2012. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22948877> >.

_____. *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and flucytosine. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 6, p. 3107-13, Jun 2012. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22391546> >.

ETTAHAR, N. et al. [Cryptococcal osteomyelitis in a patient with a lymphocytic leukemia treated with fludarabine-cyclophosphamide-rituximab]. **J Mycol Med**, v. 23, n. 1, p. 57-63, Mar 2013. ISSN 1773-0449. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23375857> >.

FELDMESSER, M. et al. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. **Infect Immun**, v. 68, n. 7, p. 4225-37, Jul 2000. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10858240> >.

FERREIRA, A. S. et al. Genotypic diversity of environmental *Cryptococcus neoformans* isolates from Northern Portugal. **Mycoses**, Jul 2013. ISSN 1439-0507. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23848429> >.

FONSECA, F. L. et al. Immunomodulatory effects of serotype B glucuronoxylomannan from *Cryptococcus gattii* correlate with polysaccharide diameter. **Infect Immun**, v. 78, n. 9, p. 3861-70, Sep 2010. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20547742> >.

FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, n. 4, p. 346-51, Aug 2006. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16814595> >.

FUCHS, B. B. et al. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. **Virulence**, v. 1, n. 6, p. 475-82, 2010 Nov-Dec 2010. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21178491> >.

_____. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to photodynamic inactivation is associated with cell wall integrity. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 8, p. 2929-36, Aug 2007. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17548495> >.

GARCIA-SOLACHE, M. A. et al. Fungal virulence in a lepidopteran model is an emergent property with deterministic features. **MBio**, v. 4, n. 3, p. e00100-13, 2013. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23631914> >.

GARCÍA-RIVERA, J. et al. *Cryptococcus neoformans* CAP59 (or Cap59p) is involved in the extracellular trafficking of capsular glucuronoxylomannan. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 2, p. 385-92, Apr 2004. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15075268> >.

GARCÍA-RODAS, R. et al. The interaction between *Candida krusei* and murine macrophages results in multiple outcomes, including intracellular survival and escape from killing. **Infect Immun**, v. 79, n. 6, p. 2136-44, Jun 2011. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21422181> >.

GLAVIS-BLOOM, J.; MUHAMMED, M.; MYLONAKIS, E. Of model hosts and man: using *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* and *Galleria mellonella* as model hosts for infectious disease research. **Adv Exp Med Biol**, v. 710, p. 11-7, 2012. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22127881> >.

GRIJPSTRA, J. et al. Production of extracellular polysaccharides by CAP mutants of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 8, n. 8, p. 1165-73, Aug 2009. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19542308> >.

GULLO, F. P. **Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment**. ROSSI, S. A.; SARDI, J. D. C. O., et al. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2013.

GULLO, F. P. et al. Antifungal activity of maytenin and pristimerin. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, p. 340787, 2012. ISSN 1741-4288. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22675379> >.

HABASH, M.; REID, G. Microbial biofilms: their development and significance for medical device-related infections. **J Clin Pharmacol**, v. 39, n. 9, p. 887-98, Sep 1999. ISSN 0091-2700. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10471979> >.

HAN, T. L.; CANNON, R. D.; VILLAS-BÔAS, S. G. The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. **Fungal Genet Biol**, v. 48, n. 8, p. 747-63, Aug 2011. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21513811> >.

HAN, Y.; LEE, J. H. Berberine synergy with amphotericin B against disseminated candidiasis in mice. **Biol Pharm Bull**, v. 28, n. 3, p. 541-4, Mar 2005. ISSN 0918-6158. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15744087> >.

HARDISON, S. E. et al. Protective immunity against pulmonary cryptococcosis is associated with STAT1-mediated classical macrophage activation. **J Immunol**, v. 189, n. 8, p. 4060-8, Oct 2012. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22984078> >.

HARRIS, J. R. et al. High prevalence of cryptococcal infection among HIV-infected patients hospitalized with pneumonia in Thailand. **Clin Infect Dis**, v. 54, n. 5, p. e43-50, Mar 2012. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22198791> >.

HICKS, J. K.; HEITMAN, J. Divergence of protein kinase A catalytic subunits in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* illustrates evolutionary reconfiguration of a signaling cascade. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 3, p. 413-20, Mar 2007. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17189488> >.

ILLNAIT-ZARAGOZI, M. T. et al. In Vitro activity of the new azole isavuconazole (BAL4815) compared with six other antifungal agents against 162 *Cryptococcus neoformans* isolates from Cuba. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 4, p. 1580-2, Apr 2008. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18212095> >.

JARVIS, J. N. et al. Managing cryptococcosis in the immunocompromised host. **Curr Opin Infect Dis**, v. 21, n. 6, p. 596-603, Dec 2008. ISSN 1473-6527. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18978527> >.

JENSEN, P. et al. The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 59, n. 3, p. 292-305, Aug 2010. ISSN 1574-695X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20579098> >.

JIANG, Z. et al. Treatment of early and established *Cryptococcus neoformans* infection with radiolabeled antibodies in immunocompetent mice. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 1, p. 552-4, Jan 2012. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22005995> >.

KASSAMALI, Z. et al. How low can you go? Use of low- and standard-dose liposomal amphotericin B for treatment of invasive fungal infections. **Int J Infect Dis**, v. 17, n. 8, p. e615-20, Aug 2013. ISSN 1878-3511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23474174> >.

KESSLER, A. T.; AL KHARRAT, T.; KOURTIS, A. P. *Cryptococcus neoformans* as a cause of bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. **J Infect Chemother**, v. 16, n. 3, p. 206-9, Jun 2010. ISSN 1437-7780. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20169387> >.

KIDD, S. E. et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 49, p. 17258-63, Dec 2004. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15572442> >.

KNOKE, M.; SCHWESINGER, G. One hundred years ago: the history of cryptococcosis in Greifswald. Medical mycology in the nineteenth century. **Mycoses**, v. 37, n. 7-8, p. 229-33, 1994 Jul-Aug 1994. ISSN 0933-7407. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7739651> >.

KOHN, L. K. et al. In vitro antiviral activity of Brazilian plants (*Maytenus ilicifolia* and *Aniba rosaeodora*) against bovine herpesvirus type 5 and avian metapneumovirus. **Pharm Biol**, v. 50, n. 10, p. 1269-75, Oct 2012. ISSN 1744-5116. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22873798> >.

KRAUS, P. R. et al. The *Cryptococcus neoformans* MAP kinase Mpk1 regulates cell integrity in response to antifungal drugs and loss of calcineurin function. **Mol Microbiol**, v. 48, n. 5, p. 1377-87, Jun 2003. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787363> >.

KRIENGKAUYKIAT, J.; ITO, J. I.; DADWAL, S. S. Epidemiology and treatment approaches in management of invasive fungal infections. **Clin Epidemiol**, v. 3, p. 175-91, 2011. ISSN 1179-1349. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21750627> >.

KRONSTAD, J. W. et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 3, p. 193-203, Mar 2011. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21326274> >.

KWON-CHUNG, K. J.; EDMAN, J. C.; WICKES, B. L. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 60, n. 2, p. 602-5, Feb 1992. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1730495> >.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHEK, I.; BENNETT, J. E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). **J Clin Microbiol**, v. 15, n. 3, p. 535-7, Mar 1982. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7042750> >.

LEITE, D. P. et al. *Cryptococcus* spp isolated from dust microhabitat in Brazilian libraries. **J Occup Med Toxicol**, v. 7, n. 1, p. 11, 2012. ISSN 1745-6673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22682392> >.

LESTER, S. J. et al. Cryptococcosis: update and emergence of *Cryptococcus gattii*. **Vet Clin Pathol**, v. 40, n. 1, p. 4-17, Mar 2011. ISSN 1939-165X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21244455> >.

LEVITZ, S. M.; SPECHT, C. A. The molecular basis for the immunogenicity of *Cryptococcus neoformans* mannoproteins. **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 4, p. 513-24, Jun 2006. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16696647> >.

LI, M.; CHEN, M.; PAN, W. Approaches on genetic polymorphism of *Cryptococcus* Species Complex. **Front Biosci**, v. 18, p. 1227-36, 2013. ISSN 1093-4715. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23747878> >.

LI, S. S.; MODY, C. H. *Cryptococcus*. **Proc Am Thorac Soc**, v. 7, n. 3, p. 186-96, May 2010. ISSN 1943-5665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20463247> >.

LIMPER, A. H. et al. An official American Thoracic Society statement: Treatment of fungal infections in adult pulmonary and critical care patients. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 183, n. 1, p. 96-128, Jan 2011. ISSN 1535-4970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21193785> >.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609> >.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. D. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e exóticas**. 2. 2008. 544 ISBN 8586714283.

MAH, T. F.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol**, v. 9, n. 1, p. 34-9, Jan 2001. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11166241> >.

MARQUES, S. A. et al. Primary cutaneous cryptococcosis in Brazil: report of 11 cases in immunocompetent and immunosuppressed patients. **Int J Dermatol**, v. 51, n. 7, p. 780-4, Jul 2012. ISSN 1365-4632. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22715820> >.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Specific antibody can prevent fungal biofilm formation and this effect correlates with protective efficacy. **Infect Immun**, v. 73, n. 10, p. 6350-62, Oct 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177306> >.

_____. *Cryptococcus neoformans* cells in biofilms are less susceptible than planktonic cells to antimicrobial molecules produced by the innate immune system. **Infect Immun**, v. 74, n. 11, p. 6118-23, Nov 2006a. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17057089> >.

_____. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 3, p. 1021-33, Mar 2006b. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16495265> >.

MARTINEZ, L. R.; FRIES, B. C. Fungal Biofilms: Relevance in the Setting of Human Disease. **Curr Fungal Infect Rep**, v. 4, n. 4, p. 266-275, Dec 2010. ISSN 1936-3761. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21660222> >.

MARTINEZ, L. R. et al. The use of chitosan to damage *Cryptococcus neoformans* biofilms. **Biomaterials**, v. 31, n. 4, p. 669-79, Feb 2010. ISSN 1878-5905. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19819009> >.

MARTINS, L. M. et al. Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piauí (northeastern Brazil). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 6, p. 725-30, Sep 2011. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22012227> >.

MARTÍN-PEÑA, A.; AGUILAR-GUISADO, M.; CISNEROS, J. M. Does the current treatment of invasive fungal infection need to be reviewed? **Enferm Infecc Microbiol Clin**, Apr 2013. ISSN 1578-1852. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23587702> >.

MATOS, C. S. et al. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus* spp. in Bahia, Brazil: molecular types and antifungal susceptibilities. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 31, n. 7, p. 1647-52, Jul 2012. ISSN 1435-4373. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22278291> >.

MATSUMOTO, M. T. et al. Genotyping, serotyping and determination of mating-type of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from São Paulo State, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 49, n. 1, p. 41-7, 2007 Jan-Feb 2007. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17384819> >.

MAUCH, R. M.; CUNHA, V. E. O.; DIAS, A. L. The copper interference with the melanogenesis OF *Cryptococcus neoformans*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 55, n. 2, p. 117-20, 2013 Mar-Apr 2013. ISSN 1678-9946. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23563765> >.

MAZZA, M. et al. *Cryptococcus gattii* in urban trees from cities in North-eastern Argentina. **Mycoses**, May 2013. ISSN 1439-0507. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23639046> >.

MCCLELLAND, E. E. et al. The Role of Host Gender in the Pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* Infections. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63632, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23741297> >.

MCLELAND, S. et al. *Cryptococcus albidus* infection in a California sea lion (*Zalophus californianus*). **J Wildl Dis**, v. 48, n. 4, p. 1030-4, Oct 2012. ISSN 1943-3700. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23060504> >.

MCNEIL, M. M. et al. Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. **Clin Infect Dis**, v. 33, n. 5, p. 641-7, Sep 2001. ISSN 1058-4838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11486286> >.

MEYER, W. et al. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerg Infect Dis**, v. 9, n. 2, p. 189-95, Feb 2003. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12603989> >.

MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clin Microbiol Rev**, v. 8, n. 4, p. 515-48, Oct 1995. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8665468> >.

MITTELMAN, M. W. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. **J Dairy Sci**, v. 81, n. 10, p. 2760-4, Oct 1998. ISSN 0022-0302. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9812281> >.

MOLINA-LEYVA, A. et al. Cutaneous *Cryptococcus laurentii* infection in an immunocompetent child. **Int J Infect Dis**, Jun 2013. ISSN 1878-3511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23791224> >.

MONARI, C. et al. Capsular polysaccharide induction of apoptosis by intrinsic and extrinsic mechanisms. **Cell Microbiol**, v. 10, n. 10, p. 2129-37, Oct 2008. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18647312> >.

MORRIS, C. E.; MONIER, J.; JACQUES, M. Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. **Appl Environ Microbiol**, v. 63, n. 4, p. 1570-6, Apr 1997. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16535579> >.

MORROW, C. A.; FRASER, J. A. Is the Nickel-Dependent Urease Complex of *Cryptococcus* the Pathogen's Achilles' Heel? **MBio**, v. 4, n. 4, 2013. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23800398> >.

MOWAT, E. et al. Phase-dependent antifungal activity against *Aspergillus fumigatus* developing multicellular filamentous biofilms. **J Antimicrob Chemother**, v. 62, n. 6, p. 1281-4, Dec 2008. ISSN 1460-2091. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18819968> >.

MOYRAND, F.; FONTAINE, T.; JANBON, G. Systematic capsule gene disruption reveals the central role of galactose metabolism on *Cryptococcus neoformans* virulence. **Mol Microbiol**, v. 64, n. 3, p. 771-81, May 2007. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17462022> >.

MYLONAKIS, E. et al. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 24, p. 15675-80, Nov 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438649> >.

MÖLLER, E. M. et al. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. **Nucleic Acids Res**, v. 20, n. 22, p. 6115-6, Nov 1992. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1461751> >.

NEGRONI, R. Cryptococcosis. **Clin Dermatol**, v. 30, n. 6, p. 599-609, 2012 Nov-Dec 2012. ISSN 1879-1131. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23068147> >.

NEOFYTOS, D. et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. **Transpl Infect Dis**, v. 12, n. 3, p. 220-9, Jun 2010. ISSN 1399-3062. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20113459> >.

NGAMSKULRUNGROJ, P. et al. The trehalose synthesis pathway is an integral part of the virulence composite for *Cryptococcus gattii*. **Infect Immun**, v. 77, n. 10, p. 4584-96, Oct 2009. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19651856> >.

NIIMI, M.; FIRTH, N. A.; CANNON, R. D. Antifungal drug resistance of oral fungi. **Odontology**, v. 98, n. 1, p. 15-25, Feb 2010. ISSN 1618-1255. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20155503> >.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Budding of melanized *Cryptococcus neoformans* in the presence or absence of L-dopa. **Microbiology**, v. 149, n. Pt 7, p. 1945-51, Jul 2003. ISSN 1350-0872. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12855745> >.

NUCCI, M. et al. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clin Infect Dis**, v. 51, n. 5, p. 561-70, Sep 2010. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20658942> >.

NUNNARI, G. et al. Cryptococcal meningitis in an HIV-1-infected person: relapses or IRIS? Case report and review of the literature. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 17, n. 11, p. 1555-9, Jun 2013. ISSN 1128-3602. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23771547> >.

ORDONEZ, M. E.; FARRAYE, F. A.; DI PALMA, J. A. Endemic Fungal Infections in Inflammatory Bowel Disease Associated with Anti-TNF Antibody Therapy. **Inflamm Bowel Dis**, May 2013. ISSN 1536-4844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23694943> >.

OSTROSKY-ZEICHNER, L. Invasive mycoses: diagnostic challenges. **Am J Med**, v. 125, n. 1 Suppl, p. S14-24, Jan 2012. ISSN 1555-7162. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22196205> >.

PARK, B. J. et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v. 23, n. 4, p. 525-30, Feb 2009. ISSN 1473-5571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19182676> >.

PEREIRA, C. B. et al. Evaluation of laccases and melanization in clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* samples by non-denaturing PAGE. **J Med Microbiol**, v. 58, n. Pt 5, p. 563-6, May 2009. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19369516> >.

PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*: a sugar-coated killer with designer genes. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 45, n. 3, p. 395-404, Sep 2005. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16055314> >.

_____. The impact of the host on fungal infections. **Am J Med**, v. 125, n. 1 Suppl, p. S39-51, Jan 2012. ISSN 1555-7162. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22196208> >.

_____. Fungal diagnosis: how do we do it and can we do better? **Curr Med Res Opin**, v. 29 Suppl 4, p. 3-11, Apr 2013. ISSN 1473-4877. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23621588> >.

PERFECT, J. R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. **Clin Infect Dis**, v. 50, n. 3, p. 291-322, Feb 2010. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20047480> >.

PFEIFFER, T. J.; ELLIS, D. H. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tereticornis*. **J Med Vet Mycol**, v. 30, n. 5, p. 407-8, 1992. ISSN 0268-1218. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1469544> >.

PIETRELLA, D. et al. An early imbalance of interleukin 12 influences the adjuvant effect of mannoproteins of *Cryptococcus neoformans*. **Cell Microbiol**, v. 6, n. 9, p. 883-91, Sep 2004. ISSN 1462-5814. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15272868> >.

PIRES, R. H.; LUCARINI, R.; MENDES-GIANNINI, M. J. Effect of usnic acid on *Candida orthopsilosis* and *C. parapsilosis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 1, p. 595-7, Jan 2012. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22006006> >.

PIRES, R. H. et al. Anticandidal efficacy of cinnamon oil against planktonic and biofilm cultures of *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis*. **Mycopathologia**, v. 172, n. 6, p. 453-64, Dec 2011. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21761153> >.

PRADO, M. et al. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513-21, May 2009. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19547881> >.

PRATES, R. A. et al. Effect of virulence factors on the photodynamic inactivation of *Cryptococcus neoformans*. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54387, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23349872> >.

QIU, Y. et al. Immune modulation mediated by cryptococcal laccase promotes pulmonary growth and brain dissemination of virulent *Cryptococcus neoformans* in mice. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e47853, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23110112> >.

RAMAGE, G. et al. Fungal biofilm resistance. **Int J Microbiol**, v. 2012, p. 528521, 2012. ISSN 1687-9198. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22518145> >.

RAMAGE, G.; WILLIAMS, C. The clinical importance of fungal biofilms. **Adv Appl Microbiol**, v. 84, p. 27-83, 2013. ISSN 0065-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23763758> >.

RAMARAO, N.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. **J Vis Exp**, n. 70, p. e4392, 2012. ISSN 1940-087X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23271509> >.

RAVI, S. et al. Biofilm Formation by *Cryptococcus neoformans* Under Distinct Environmental Conditions. **Mycopathologia**, v. 167, n. 6, p. 307–314, 2009. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4278410> >.

RETINI, C. et al. Encapsulation of *Cryptococcus neoformans* with glucuronoxylomannan inhibits the antigen-presenting capacity of monocytes. **Infect Immun**, v. 66, n. 2, p. 664-9, Feb 1998. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9453624> >.

RIVAS DA SILVA, A. C. et al. Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 6305-16, 2012. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22634841> >.

ROBERTSON, E. J.; CASADEVALL, A. Antibody-mediated immobilization of *Cryptococcus neoformans* promotes biofilm formation. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, n. 8, p. 2528-33, Apr 2009. ISSN 1098-5336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19251903> >.

RODRIGUES, G. B. et al. In vitro photodynamic inactivation of *Cryptococcus neoformans* melanized cells with chloroaluminum phthalocyanine nanoemulsion. **Photochem Photobiol**, v. 88, n. 2, p. 440-7, 2012 Mar-Apr 2012. ISSN 1751-1097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22145636> >.

RODRIGUES, M. L.; NIMRICHTER, L. In good company: association between fungal glycans generates molecular complexes with unique functions. **Front Microbiol**, v. 3, p. 249, 2012. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22787459> >.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 4, p. 275-88, Apr 2011. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21394104> >.

SAAG, M. S. et al. Comparison of amphotericin B with fluconazole in the treatment of acute AIDS-associated cryptococcal meningitis. The NIAID Mycoses Study Group and the AIDS Clinical Trials Group. **N Engl J Med**, v. 326, n. 2, p. 83-9, Jan 1992. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1727236> >.

SAFDAR, A. et al. Drug-induced nephrotoxicity caused by amphotericin B lipid complex and liposomal amphotericin B: a review and meta-analysis. **Medicine (Baltimore)**, v. 89, n. 4, p. 236-44, Jul 2010. ISSN 1536-5964. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20616663> >.

SANTOS, W. R. et al. Primary endemic Cryptococcosis gattii by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 8, p. 813-8, Dec 2008. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19148422> >.

SANTOS-OLIVEIRA, R.; COULAUD-CUNHA, S.; COLAÇO, W. **Review of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribution to the studies of pharmacological properties.** Revista Brasileira de Farmacognosia. 2009

SARDI, J. C. et al. Adhesion and invasion of *Candida albicans* from periodontal pockets of patients with chronic periodontitis and diabetes to gingival human fibroblasts. **Med Mycol**, v. 50, n. 1, p. 43-9, Jan 2012. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21671830> >.

_____. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **J Med Microbiol**, v. 62, n. Pt 1, p. 10-24, Jan 2013. ISSN 1473-5644. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23180477> >.

SCORZONI, L. et al. Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e60047, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23555877> >.

SERENA, C. et al. In vitro interactions of micafungin with other antifungal drugs against clinical isolates of four species of *Cryptococcus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 7, p. 2994-6, Jul 2005. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15980382> >.

SHAH, V. B. et al. Primary cryptococcal prostatitis--rare occurrence. **J Assoc Physicians India**, v. 60, p. 57-9, May 2012. ISSN 0004-5772. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23029729> >.

SIMÕES, C. M. D. O. et al. **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. Porto Alegre Santa Catarina 2010. 1102 ISBN 9788532803955.

SOARES, B. M. et al. *Cryptococcus gattii*: in vitro susceptibility to photodynamic inactivation. **Photochem Photobiol**, v. 87, n. 2, p. 357-64, 2011 Mar-Apr 2011. ISSN 1751-1097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21114500> >.

SORRELL, T. C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. **Med Mycol**, v. 39, n. 2, p. 155-68, Apr 2001. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11346263> >.

STEENBERGEN, J. N. et al. *Cryptococcus neoformans* virulence is enhanced after growth in the genetically malleable host *Dictyostelium discoideum*. **Infect Immun**, v. 71, n. 9, p. 4862-72, Sep 2003. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12933827> >.

STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 26, p. 15245-50, Dec 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11742090> >.

STIE, J.; FOX, D. Induction of brain microvascular endothelial cell urokinase expression by *Cryptococcus neoformans* facilitates blood-brain barrier invasion. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e49402, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23145170> >.

SUN, F. et al. Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. **Future Microbiol**, v. 8, p. 877-86, Jul 2013. ISSN 1746-0921. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23841634> >.

TEODORO, V. L. et al. Environmental isolation, biochemical identification, and antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus* species. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 46, n. 6, p. 759-64, 2013 Nov-Dec 2013. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24474019> >.

THÉRAUD, M. et al. Efficacy of antiseptics and disinfectants on clinical and environmental yeast isolates in planktonic and biofilm conditions. **J Med Microbiol**, v. 53, n. Pt 10, p. 1013-8, Oct 2004. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15358824> >.

TOCCI, N. et al. Root cultures of *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* elicited with chitosan and production of xanthone-rich extracts with antifungal activity. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 91, n. 4, p. 977-87, Aug 2011. ISSN 1432-0614. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21547455> >.

TORRES-RODRÍGUEZ, J. M.; ALVARADO-RAMÍREZ, E.; GUTIÉRREZ-GALLEGU, R. [Urease activity in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*]. **Rev Iberoam Micol**, v. 25, n. 1, p. 27-31, Mar 2008. ISSN 1130-1406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18338924> >.

TORRES-RODRÍGUEZ, J. M. et al. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in an immunocompetent mouse model. **Med Mycol**, v. 41, n. 1, p. 59-63, Feb 2003. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12627805> >.

TORTORANO, A. M. et al. Invasive fungal infections in the intensive care unit: a multicentre, prospective, observational study in Italy (2006-2008). **Mycoses**, v. 55, n. 1, p. 73-9, Jan 2012. ISSN 1439-0507. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21668521> >.

TRILLES, L. et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 455-62, Aug 2008. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18797758> >.

TRÉ-HARDY, M. et al. In vitro activity of antibiotic combinations against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cultures. **Int J Antimicrob Agents**, v. 31, n. 4, p. 329-36, Apr 2008. ISSN 0924-8579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18280117> >.

TSENG, H. K. et al. Microbiological, epidemiological, and clinical characteristics and outcomes of patients with cryptococcosis in Taiwan, 1997-2010. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61921, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23613973> >.

VAN DER HORST, C. M. et al. Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired immunodeficiency syndrome. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group and AIDS Clinical Trials Group. **N Engl J Med**, v. 337, n. 1, p. 15-21, Jul 1997. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9203426> >.

VARTIVARIAN, S. E. et al. Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. **J Infect Dis**, v. 167, n. 1, p. 186-90, Jan 1993. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8418165> >.

VECCHIARELLI, A.; MONARI, C. Capsular Material of *Cryptococcus neoformans*: Virulence and Much More. **Mycopathologia**, Feb 2012. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22314939> >.

VECCHIARELLI, A. et al. Elucidating the immunological function of the *Cryptococcus neoformans* capsule. **Future Microbiol**, v. 8, n. 9, p. 1107-16, Sep 2013. ISSN 1746-0921. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24020739> >.

VILLENA, S. N. et al. Capsular polysaccharides galactoxylomannan and glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* induce macrophage apoptosis mediated by Fas ligand. **Cell Microbiol**, v. 10, n. 6, p. 1274-85, Jun 2008. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18284419> >.

VOLTAN, A. R. et al. Early Endosome Antigen 1 (EEA1) decreases in macrophages infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol**, Apr 2013. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23566224> >.

WADE, R. L. et al. Nephrotoxicity and other adverse events among inpatients receiving liposomal amphotericin B or amphotericin B lipid complex. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 76, n. 3, p. 361-7, Jul 2013. ISSN 1879-0070. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23774005> >.

WALSH, T. J. et al. Ventriculoatrial shunt infection due to *Cryptococcus neoformans*: an ultrastructural and quantitative microbiological study. **Neurosurgery**, v. 18, n. 3, p. 373-5, Mar 1986. ISSN 0148-396X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3517675> >.

WAND, M. E. et al. Acinetobacter baumannii virulence is enhanced in *Galleria mellonella* following biofilm adaptation. **J Med Microbiol**, v. 61, n. Pt 4, p. 470-7, Apr 2012. ISSN 1473-5644. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22194338> >.

WANG, H. et al. The efficacy of self-assembled cationic antimicrobial peptide nanoparticles against *Cryptococcus neoformans* for the treatment of meningitis. **Biomaterials**, v. 31, n. 10, p. 2874-81, Apr 2010. ISSN 1878-5905. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20044131> >.

WILLIAMS, D. L.; COSTERTON, J. W. Using biofilms as initial inocula in animal models of biofilm-related infections. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 100, n. 4, p. 1163-9, May 2012. ISSN 1552-4981. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22120924> >.

WILLIAMSON, P. R. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. **J Bacteriol**, v. 176, n. 3, p. 656-64, Feb 1994. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8300520> >.

WILSON, M. Bacterial biofilms and human disease. **Sci Prog**, v. 84, n. Pt 3, p. 235-54, 2001. ISSN 0036-8504. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11732158> >.

WRIGHT, L. C. et al. Cryptococcal phospholipases: a novel lysophospholipase discovered in the pathogenic fungus *Cryptococcus gattii*. **Biochem J**, v. 384, n. Pt 2, p. 377-84, Dec 2004. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15320865> >.

XU, S. F. et al. Investigation of inflammatory responses of pulmonary microvascular endothelial cells induced by lipopolysaccharide and mechanism. **Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi**, v. 34, n. 11, p. 816-20, Nov 2011. ISSN 1001-0939. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22333467> >.

YAGUCHI, T. et al. Antifungal activity of the novel adduct, GX-95, of silver with nanometer-scale particles to peptidic hydrolysates from collagen. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 48, n. 2, p. 97-100, 2007. ISSN 0916-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17502845> >.

ZARAGOZA, R.; PEMÁN, J. Antifungal treatment options in the critically ill patient. **Rev Iberoam Micol**, v. 29, n. 2, p. 108-13, 2012 Apr-Jun 2012. ISSN 2173-9188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22463788> >.

ZHAI, B. et al. Congenic Strains of the Filamentous Form of *Cryptococcus neoformans* for Studies of Fungal Morphogenesis and Virulence. **Infect Immun**, v. 81, n. 7, p. 2626-37, Jul 2013. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23670559> >.

ZHOU, Y. et al. In vitro interactions between aspirin and amphotericin B against planktonic cells and biofilm cells of *Candida albicans* and *C. parapsilosis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 6, p. 3250-60, Jun 2012. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22391539> >.

ZHU, F. et al. Drug discovery prospect from untapped species: indications from approved natural product drugs. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e39782, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22808057> >.

ZHU, X. et al. Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. **Infect Immun**, v. 69, n. 9, p. 5589-96, Sep 2001. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11500433> >.

ZICKER, M. et al. Epidemiology of fungal infections in liver transplant recipients: a six-year study of a large Brazilian liver transplantation centre. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 3, p. 339-45, May 2011. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21655823> >.

8. Apêndice

Apêndice A

Tabela 1. Identificação dos isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* por PCR-RFLP.

Ordem no gel	Localidade	Amostra	CGB	Gênero/Espécie	Variedade	Tipo Molecular
1	Parques e Ruas	B 5.1	Negativo	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>grubbii</i>	VNI
2	Barracões abandonados	M 16.1	Negativo	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>grubbii</i>	VNI
3	Barracões abandonados	M 16.2	Negativo	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>grubbii</i>	VNI
4	Calopsita	CER	Positivo	<i>Cryptococcus gattii</i>		VGII
5	Psitasídeo	118	Positivo	<i>Cryptococcus gattii</i>		VGII
6	Barracões abandonados	M 21.2	Negativo	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>grubbii</i>	VNI
7	Barracões abandonados	M 23.1	Negativo	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>grubbii</i>	VGII
8	Barracões abandonados	M 28.3	Negativo	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>grubbii</i>	VNI
9	Hospitais e/ou Proximidades	Hp 3.4	Negativo	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>grubbii</i>	VNI
10	Hospitais e/ou Proximidades	Hp 6.0	Negativo	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>grubbii</i>	VNI
11	Hospitais e/ou Proximidades	Hp 6.1	Negativo	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>grubbii</i>	VNI
12	Hospitais e/ou Proximidades	Hp 6.3	Negativo	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>grubbii</i>	VNI
13	Hospitais e/ou Proximidades	Hp 6.4	Negativo	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>grubbii</i>	VNI
14	Hospitais e/ou Proximidades	Hp 6.5	Negativo	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>grubbii</i>	VNI
15	Hospitais e/ou Proximidades	Hp 8.2	Negativo	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>grubbii</i>	VNI
16	Hospitais e/ou Proximidades	Hp 10.0	Negativo	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>grubbii</i>	VNI
17	Barracões abandonados	M 16.3	Negativo	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>grubbii</i>	VNI
18	Barracões abandonados	M 21.1	Negativo	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>grubbii</i>	VNI
19	Humano	EAF	Negativo	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>grubbii</i>	VNI

Apêndice B

Tabela 2. Iniciadores usados para qRT-PCR

Genes	Sequencia
<i>LAC1</i> <i>C. neoformans</i>	Sense: 5' GCCATCAGTCAGGCACGTT 3' Antisense: TCGGCCATGGAATTGGAAT 5'
<i>LAC1</i> <i>C. gattii</i>	Sense: 5' TCCCTACGAGAGCACATTGGT 3' Antisense: 3' CCCCTGCCCCCATGTC 5'
<i>URE1</i> <i>C. neoformans</i>	Sense: 5' TCGTATCGGTGAAGTCGTCAC 3' Antisense: 3' GGACCACGGAATTGCTTCAT 5'
<i>URE1</i> <i>C. gattii</i>	Sense: 5' GCCGGACGTCATTGACTTTT 3' Antisense: 3' CCCAGTCGTTGGTCCAA 5'
<i>CAP59</i> <i>C. neoformans</i>	Sense: 5' GATCTGGGAGCGCTGTAGAC 3' Antisense: 3' TCTCTGCTCGTCGGTATCCT 5'
<i>CAP59</i> <i>C. gattii</i>	Sense: 5' CCTCCATATCCTCGACCTCA 3' Antisense: 3' AGTTGGACCACGGTTTCTTG5'
<i>GAPDH</i> <i>C. neoformans</i>	Sense: 5' TTTCCCGCGACTTTTTTG 3' Antisense: 3' TCGCAGCCGAGTCTACGAT 5'
<i>GAPDH</i> <i>C. gattii</i>	Sense: 5' GGACCTCGTGCGCTTTATTC 3' Antisense: 3' GCGGTAGGAGTCGGCACTT 5'

Capítulo II



Virulence of *Cryptococcus* sp. Biofilms *In Vitro* and *In Vivo* using *Galleria mellonella* as an Alternative Model

Tatiane Benaducci¹, Janaina de C. O. Sardi¹, Natalia M. S. Lourencetti¹, Liliana Scorzoni¹, Fernanda P. Gullo¹, Suélen A. Rossi¹, Jaqueline B. Derissi¹, Márcia C. de Azevedo Prata², Ana M. Fusco-Almeida¹ and Maria J. S. Mendes-Giannini^{1*}

¹ Laboratório de Micologia, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, Brazil, ² Embrapa Brasileira de Agropecuária, Juiz de Fora, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Leland Shapiro, Denver Veterans Affairs Medical Center and University of Colorado Denver, USA

Reviewed by:

Frederic Lamothe, Lausanne University Hospital, Switzerland
Mary Ann Degroote, Colorado State University, USA

*Correspondence: Maria J. S. Mendes-Giannini giannini@fcar.unesp.br; giannini@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to Infectious Diseases, a section of the journal *Frontiers in Microbiology*

Received: 04 August 2015

Accepted: 23 February 2016

Published: 09 March 2016

Citation: Benaducci T, Sardi JdCO, Lourencetti NMS, Scorzoni L, Gullo FP, Rossi SA, Derissi JB, de Azevedo Prata MC, Fusco-Almeida AM and Mendes-Giannini MJS (2016) Virulence of *Cryptococcus* sp.

Biofilms *In Vitro* and *In Vivo* using *Galleria mellonella* as an Alternative Model. *Front. Microbiol.* 7:290. doi: 10.3389/fmicb.2016.00290

Cryptococcus neoformans and *C. gattii* are fungal pathogens that are most commonly found in infections of the central nervous system, which cause life-threatening meningoencephalitis and can grow as a biofilm. Biofilms are structures conferring protection and resistance of microorganism to the antifungal drugs. This study compared the virulence of planktonic and biofilm cells of *C. neoformans* and *C. gattii* in *Galleria mellonella* model, as well as, the quantification of gene transcripts *LAC1*, *URE1*, and *CAP59* by real time PCR. All three of the genes showed significantly increased expressions in the biofilm conditions for two species of *Cryptococcus*, when compared to planktonic cells. *C. neoformans* and *C. gattii* cells in the biofilm forms were more virulent than the planktonic cells in *G. mellonella*. This suggests that the biofilm conditions may contribute to the virulence profile. Our results contribute to a better understanding of the agents of cryptococcosis in the host-yeast aspects of the interaction.

Keywords: *Cryptococcus* sp., biofilms, virulence, *Galleria mellonella*

INTRODUCTION

Invasive fungal infections (IFIs) are of global importance. An increasing number of cases have been observed in recent years, and despite current antifungal therapy, mortality rates are high (Perfect, 2013). Among the pathogens causing IFIs, the yeast *Cryptococcus neoformans* is the most prominent in infections of immunocompromised individuals, but *C. gattii* can also cause infections in immunocompetent persons (Tortorano et al., 2012; Perfect, 2013; Prates et al., 2013). The number of cases of cryptococcosis has increased exponentially in the last 30 years due to the advent of AIDS, the use of immunosuppressive therapy in transplant patients and the use of chemotherapeutic agents (McClelland et al., 2013). The use of antiretroviral therapy has been shown to be important in the diagnosis of cryptococcal meningitis in HIV patients, because increasing of CD4 creates benefits for early diagnosis of cryptococcosis through serology (Rajasingham and Boulware, 2015). Although the most serious disease manifestation is meningoencephalitis, cryptococcal pneumonia is underdiagnosed and may disseminate to the central nervous system (CNS) and other sites, depending upon host defenses (Brizendine et al., 2011).

Cryptococcus neoformans remains the most prevalent human pathogen in this genus and is found in the environment worldwide. Formerly, *C. gattii* was reported mainly in Australia and other subtropical and tropical areas, where it was linked to eucalyptus trees (Smith and Kauffman, 2012). Approximately 1 million cases of cryptococcosis are reported annually, resulting in 600,000 deaths per year (Stie and Fox, 2012; Zhu et al., 2012) and approximately one third of cases (Pyrgos et al., 2013) were related to non-HIV (Bratton et al., 2012; Brizendine et al., 2013). In Brazil, cryptococcosis has recently been identified as the most fatal mycosis in AIDS patients (Albuquerque and Rodrigues, 2012). The mechanisms of pathogenicity and virulence factors correspond, respectively, to the strategies of the organism or its products to contribute to its virulence. The virulence factors of infectious agents are complex and multifactorial. Polysaccharide synthesis; the capsule; melanin; ability to growth at 37°C; extracellular enzymes such as laccase, phospholipase B, and urease; and biofilm formation are considered to be virulence factors for *Cryptococcus* sp. (Casadevall and Pirofski, 2001; Robertson and Casadevall, 2009; Zaragoza et al., 2009; Kronstad et al., 2011). Biofilms are communities of microorganisms involving an extracellular matrix attached to a solid surface, whose development provides important benefits such as increased nutrient concentrations in the biofilm-liquid interface. The polymer matrix promotes the adsorption of nutrient molecules and provides protection from environmental insults (pH changes, salt concentration, dehydration, aggressive chemicals, bactericides, antibiotics, predators, lytic bacteria, and heavy metals). Thus, biofilm microorganisms differ profoundly from planktonic cells but retain their invasiveness and ability to evade the host immune system (Costerton et al., 1995; Sardi et al., 2013). *C. neoformans* is able to form biofilm on medical devices, including ventriculoatrial shunt catheters (Walsh et al., 1986; Bach et al., 1997), peritoneal dialysis fistula (Braun et al., 1994) and prosthetic cardiac valves (Banerjee et al., 1997), that highlight the ability of this organism to adhere to medical devices. Normally, patients who do not benefit from antifungal therapy and patients who present serious visual loss or ocular palsies or remain with high cerebrospinal fluid pressure levels, must be considered for ventriculoperitoneal placement (Corti et al., 2014). The increasing use of shunts to manage intracranial hypertension associated with cryptococcal meningoencephalitis suggests the importance of investigating the biofilm-forming properties of this organism (Bach et al., 1997) apud (Martinez and Casadevall, 2015).

Non-conventional animal models of infection can be used to investigate the virulent traits of a pathogen or the therapeutic efficacy of a drug, as well as the host-pathogen interactions. The *Galleria mellonella* model represents a versatile experimental system to study fungal virulence and antifungal efficacy (Mylonakis et al., 2005; Fuchs and Mylonakis, 2006; Scorzoni et al., 2013).

The objective of this study was to evaluate the ability of *C. neoformans* and *C. gattii* in biofilm and planktonic forms in *G. mellonella*, an alternative model, and to relatively quantify the gene transcripts involved in virulence by real time PCR.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms

Cryptococcus neoformans var. *grubii* ATCC 90112, serotype A, molecular type VNI and *C. gattii* ATCC 56990, serotype BC, molecular type VGIII, belonging to the mycology collection of the Laboratory of Clinical Mycology, Department of Clinical Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, UNESP, Araraquara were used in this study. Yeasts were kept frozen in glycerol and subcultured at the time of the experiment.

Biofilm Formation

Both *C. neoformans* and *C. gattii* were grown in Sabouraud dextrose broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) with shaking (200 rpm) at 37°C until the late log phase (as determined by a growth curve constructed from absorbance readings at an optical density of 600 nm). Biofilm formation was performed according to Martinez and Casadevall (2005), with some modifications. The cells were collected by centrifugation, washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), counted with a hemocytometer, and suspended at 1×10^8 cells/mL in PBS. For each microorganism, 100 µL of the suspension was added into individual polystyrene wells in 96-well plates (TPP Trasadingen, Switzerland), and the plates were incubated at 37°C without shaking for 2 h for the adhesion stage. The mature biofilms were formed for 72 h with shaking at 70 rpm at 37°C in RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) that contained L-glutamine, but not sodium bicarbonate, was supplemented with 2% glucose, and was buffered to pH 7.0 using 0.165 M MOPS, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The wells without *Cryptococcus* cells were used as controls. Following the adhesion stage, the wells containing *Cryptococcus* biofilms were washed three times with 0.05% Tween 20 in PBS to remove non-adhered cryptococci. Fungal cells that remained attached to the plastic surface were considered true biofilms. All assays were carried out in triplicate.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

Cryptococcus sp. biofilms were grown on glass coverslips in microtiter plates with RPMI-1621 for 72 h. Coverslips with biofilms were then washed three times with PBS and transferred to another microtiter plate containing 2.5% glutaraldehyde and incubated for 48 h at 4°C. The samples were serially dehydrated in alcohol, fixed in a critical-point drier (Samdri-790; Tousimis, Rockville, MD, USA), coated with gold-palladium (Desk-1; Denton Vacuum, Inc., Cherry Hill, NJ, USA), and viewed with a JEOL (Tokyo, Japan) JSM-6400 scanning electron microscope at a voltage of 10.0 kV; the image was captured at 10,000×.

Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Confocal microscopy was performed according to Martinez and Casadevall, 2005. Mature biofilms were incubated for 45 min at 37°C in a solution of CAAF 488 (Concanavalin A conjugated to Alexa Fluor 488, CAAF; Molecular Probes, USA) and FUN 1 (Molecular Probes, USA). Thus, 4 µL of FUN 1 (10 mM) and 15 µL of CAAF 488 (5 mg/mL) were added to 3 mL of sterile PBSto obtain 10 µg/mL FUN 1 and 25 µg/mL CAAF. Subsequently, the coverslips were washed with distilled water taken from the wells and inverted over 4 µL of Fluoromount-G (Sigma-Aldrich, USA) that was previously deposited on microscope slides for observation under confocal microscopy (LSM 510 META, Zeiss). These trials were conducted in collaboration with the Oswaldo Cruz Institute in Rio de Janeiro, Department of Cell Biology, under the coordination of Professor Dr. Marcelo Machado Pelajo.

Metabolic Activity of the Biofilm

The metabolic activity of the biofilms was evaluated according to (Martinez and Casadevall, 2006b). Semi-quantitative measurements of planktonic cells, biofilm formations and mature biofilms of *C. neoformans* and *C. gattii* were obtained from the reduction assay of 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphonyl)-5-[carbonyl (phenylamino)]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT). The metabolic activity of the cells was measured by mitochondrial dehydrogenase activity, which reduces the XTT tetrazolium salt to formazan salt, resulting in a colorimetric change. For this assay, 50 µL of XTT solution (1 mg/mL in PBS) and 4 µL of a solution of menadione (1 mM in acetone, Sigma Chemical Co.) were added to each well. The microplates were incubated at 37°C for 5 h and measured at 490 nm (Microplate Reader iMark TM, BIO-RAD). In all experiments, RPMI was included as a negative control.

Antifungal Activity of Amphotericin B

The antifungal activity of amphotericin B (AMB) against planktonic cells and biofilm of *C. neoformans* and *C. gattii* was evaluated by metabolic activity quantification. AMB was tested in range of concentration equal to 0.0625–128 µg/mL for 48 h of treatment and the fungicidal concentration (FC) was considered the lower concentration to metabolic activity below 10% (Martinez and Casadevall, 2006b). This assay was performed XTT assay as previously described.

RNA Isolation and cDNA Synthesis

Total RNA was extracted from *Cryptococcus* sp. in planktonic and biofilm formations using TRIzol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA, USA) according to the manufacturer's instructions. The total RNA from the two situations was treated with DNaseI (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); its concentration and purity were then determined using a spectrophotometer (GE, Nanovue Plus). The integrity of the RNA was verified by electrophoresis with 1% agarose gels. RNA was converted to cDNA using 1 µg of total RNA and reverse transcriptase (RevertAid™ H Minus Reverse Transcriptase, Fermentas Life Sciences, Canada).

Real Time PCR of the Genes *LAC1*, *URE1*, and *CAP59* in Planktonic and Biofilm Formations

For the analysis of differential gene expressions by RT-PCR (Real Time PCR), specific primers were used for genes (Supplementary Table S1) encoding proteins that are differentially expressed in *C. neoformans* (ATCC 90112) and *C. gattii* (ATCC 56990) strains in planktonic and biofilm formations. Primers were used at 0.8 µM each for specific forward and reverse primer and cDNA at 20 ng in 20 µL reactions. The test was performed by Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific), and the *GAPDH* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) gene was used as a reference gene. The reaction program was 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, and 40 cycles of 95°C for 15 s, and annealing and synthesis occurred at 60°C for 1 min. Following PCR, a melting-curve analysis was performed, which confirmed that the signal corresponded to a single PCR product in an Applied Biosystems 7500 cycler. The data were analyzed by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (ΔC_t target- ΔC_t endogen; Livak and Schmittgen, 2001).

Virulence of Planktonic and Biofilm Cells in *Galleria mellonella*

Galleria mellonella caterpillars were produced by EMBRAPA – Juiz de Fora/MG. Larvae weighing 100–200 mg were selected for the experiment. The day before the experiment, the larvae were stored at 37°C. The biofilms were destroyed with a scraper, and the cells were counted in a hemocytometer chamber together with the planktonic cells for the final concentration of 5×10^6 cells/larvae (cell concentrations previously standardized with planktonic cells). Larvae were infected with 10 µL of inocula injected into the hemocell through the last proleg using a Hamilton syringe (Hamilton, EUA). The groups of *G. mellonella* were incubated at 37°C for 7 days, and their death was monitored daily. The death of the larvae was assessed by the lack of movement after touching them with tweezers. For each condition, a total of 16 larvae were used, and each experiment was repeated at least twice.

Statistical Analysis

All analyses of the data were performed with GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Survival curves were analyzed by the Log-rank (Mantel-Cox) Test. Real time PCR was performed statistically by *t*-test and *p*-values < 0.05 were considered significant.

RESULTS

Biofilm Formation

The ability of the *C. neoformans* and *C. gattii* strains to form biofilms *in vitro* was evaluated. Biofilm formation by *Cryptococcus* sp. was demonstrated by SEM. It was observed that every strain was able to form agglomerates of cells characterized by a microorganism community firmly adhered to a non-biological surface and resulting in the

formation of a mature biofilm. The SEM data provided useful information on the cell morphology present in the biofilm structure. The biofilms of *C. neoformans* (Figures 1A,B) and *C. gattii* (Figures 1C,D) strains consist of a dense network of yeasts.

Confocal Laser Microscopy

Confocal laser scanning microscopy is useful for determining the viability/activity of the cells adhered to the glass surface and for analyzing the biofilm thickness. Applying two fluorochromes, Concanavalin A conjugated to Alexa Fluor 488 (CAAF) and FUN1, to determine the activity/viability allows the observation of metabolically active structures in fungal cells. In combination, the CAAF specifically binds to cell wall polysaccharides. Images of mature biofilms of *C. neoformans* ATCC 90112 and

C. gattii ATCC 56990 were acquired by confocal microscopy (Figures 2A,C). The yellow-orange staining due to FUN1 is dense in the cytoplasm of metabolically active cell aggregates, while the green coloration results from the binding of Concanavalin A to the glucose and mannose moieties of the fungal cell wall. Orthogonal images of biofilms of the strains were analyzed to determine their thickness and architecture. Sections of the three-dimensional images showed that the biofilm of *C. neoformans* strain ATCC 90112 has a thickness of 10 μm (Figure 2B), while *C. gattii* ATCC 56990 (Figure 2D) has a thickness of 5.4 μm .

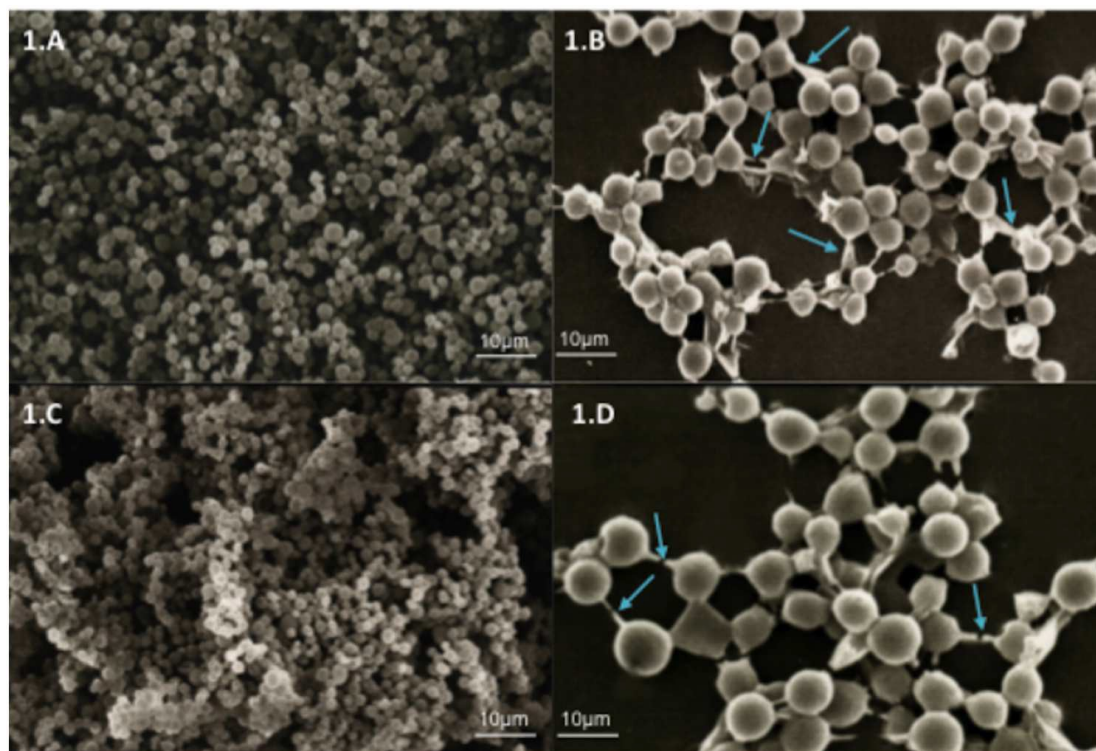
Kinetics of Biofilm Formation

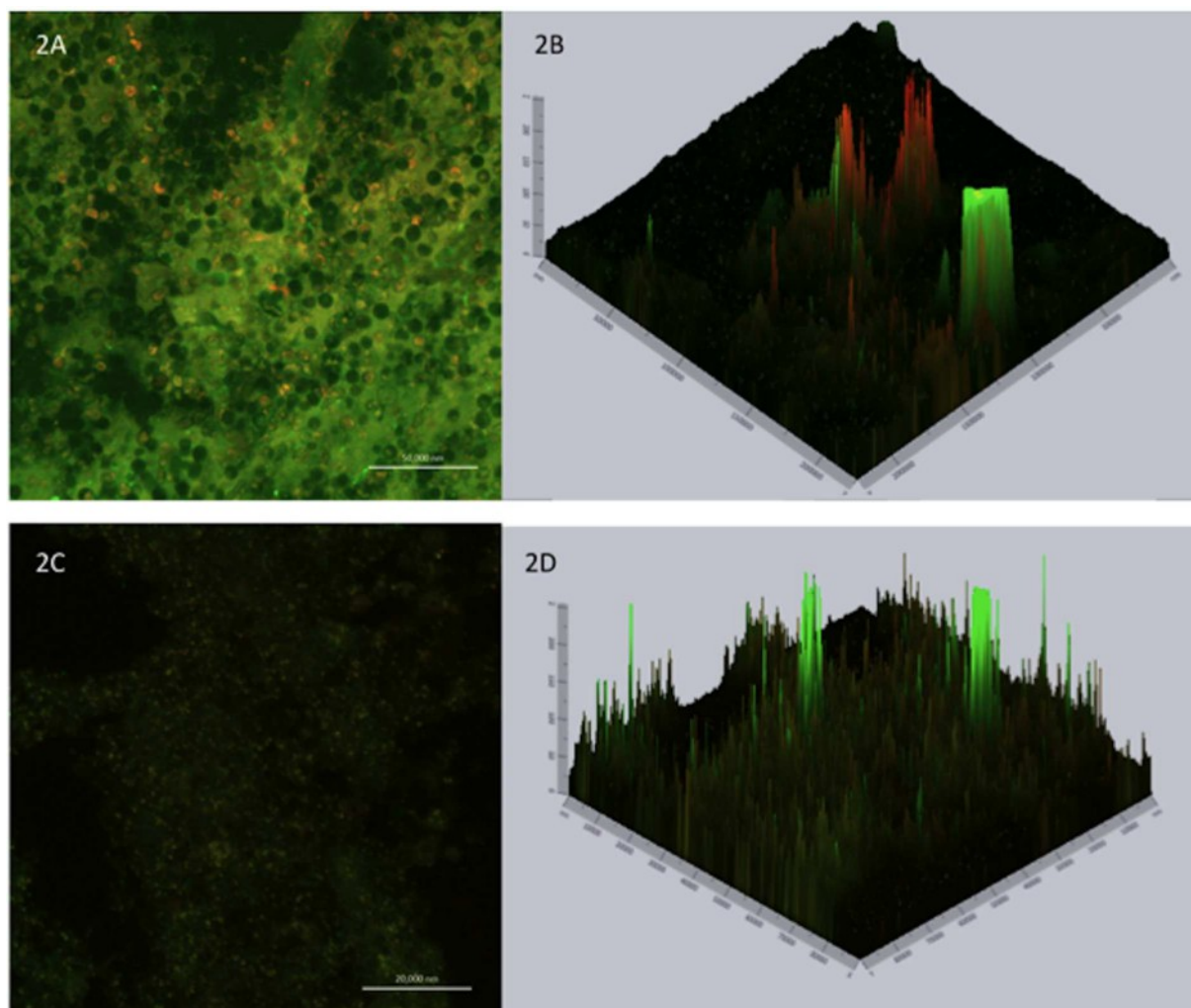
The kinetics of biofilm formation on polystyrene microdilution plates by both *Cryptococcus* species was compared using the colorimetric XTT reduction assay to determine metabolic activity. During a period of 2 h, the *Cryptococcus* yeast became firmly adhered to the plastic surface. In the intermediate stage (12 h) the fungal population increased to form a cell monolayer, thus initiating the process of biofilm formation. During the maturation stage (24–72 h), fungal growth involves the formation of microcolonies consisting of clustered cells and resulting in compact structures adhering to the plastic surface.

All samples produced biofilms from 24 to 72 h, and the initial biofilm formation was observed by 2 h of incubation, which includes the period of initial adhesion. Over a period of 12 to 24 h, a continuously increasing biofilm was observed. The kinetics of biofilm formation was similar in both strains analyzed and showed no significant differences (Figure 3).

Antifungal Activity of Amphotericin B

The Supplementary Table S2 shows the values of fungicidal concentration (FC) of AMB for *C. neoformans* and *C. gattii* in planktonic and biofilm conditions. The FC was 0.5 and 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for planktonic cells of *C. neoformans* and *C. gattii*,





respectively. In the biofilm condition, we observed an increase of the fungicidal concentration for *C. neoformans* as well as *C. gattii*, both with concentration of 64.0 $\mu\text{g/mL}$.

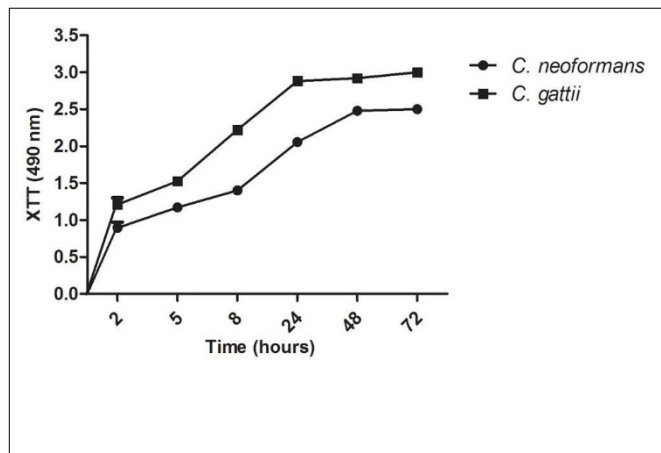
Gene Expressions of *LAC1*, *URE1*, and *CAP59* in Biofilms and Planktonic Cells of *Cryptococcus* sp.

We used real time PCR assay, with *GAPDH* as the internal control. The results of the relative gene expressions of *URE1*, *LAC1*, and *CAP59* with biofilm and planktonic cells of *C. neoformans* and *C. gattii* are shown in Figure 4. All three of the genes showed significantly increased expressions in the biofilm conditions for two species of *Cryptococcus*, when compared to planktonic cells. However, we can see that the increased expression of genes *LAC1* and *URE1* was more relevant when comparing biofilm and planktonic cells of *C. gattii*. On the

other hand, the increase in *CAP59* expression in biofilms of *C. neoformans*, when compared with planktonic cells, showed higher significance than other genes.

Virulence of Planktonic and Biofilm Cells in *Galleria mellonella*

To determine an adequate concentration for the virulence tests with planktonic and biofilm cells, survival curves were created for different concentrations of yeast (planktonic). The concentration of 5×10^6 cells/larvae was selected for the experiments (data not shown). The virulence of the biofilm and planktonic cells were then compared *in vivo* in the *G. mellonella* model. After 4 days, all larvae infected with cells from *C. neoformans* and *C. gattii* biofilms were dead. Larvae infected with planktonic cells exhibited 30% live larvae when infected with *C. neoformans* and 80% live larvae when infected with *C. gattii* in the time of 4 days.



It is clear that cells from biofilms are more virulent, and in the final part of the experiment (7 days), live larvae still remained. When larvae were infected with planktonic cells, the death rate did not reach 100% in any of the strains tested (Figure 5).

DISCUSSION

Characterizations of the virulence factors of infectious agents have revealed great complexity. These factors can be divided into two categories: those that promote colonization and invasion as biofilms and those that damage the host by the production of hydrolytic enzymes (Mendes-Giannini et al., 2000). Biofilm formation is a common mechanism used by microorganisms to survive in hostile environments and to colonize and establish themselves in new environments, thus conferring protection against their destruction (Hall-Stoodley et al., 2004). Moreover, fungal biofilms are an increasing clinical problem associated with high mortality rates (Williams and Costerton, 2012). The production of melanin (Williamson, 1994), the presence of capsules (Kwon-Chung et al., 1992), growth at 37°C (Kraus et al., 2003), alpha mating type (Kwon-Chung et al., 1982), and the production of phospholipase (Wright et al., 2004), superoxide dismutase (Cox et al., 2003), protein kinases (Alspaugh et al., 1998), and urease (Cox et al., 2000), as well as the synthesis of polysaccharides (Albuquerque et al., 2014), were phenotypically and molecularly characterized as *in vivo* virulence factors related to invasion and survival in the host (Perfect, 2005).

In this study, strains of *C. neoformans* and *C. gattii* were able to form biofilms. These data were confirmed, and electron microscopy showed the formation of a dense network of yeasts with a self-produced extracellular matrix linking the cells of *Cryptococcus* sp. Factors such as the characteristics of the medium and the attachment surface are important for biofilm development by *Cryptococcus* sp., and strains of *C. neoformans* formed denser biofilms when they were cultured in RPMI 1640 medium (Martinez and Casadevall, 2006a). Biofilm formation is the most common growth form of microorganisms in nature; it represents up to 65% of all clinical infections, and given the high level of antimicrobial resistance, biofilms represent a huge problem in clinical practice (Donlan and Costerton,

2002; Ramage and Williams, 2013; Martinez and Casadevall, 2015). Biofilm production by *Cryptococcus* species has often been described as a strategy associated with chronic infection resulting from acquired resistance to host immune mechanisms and antifungal therapy (Martinez et al., 2006).

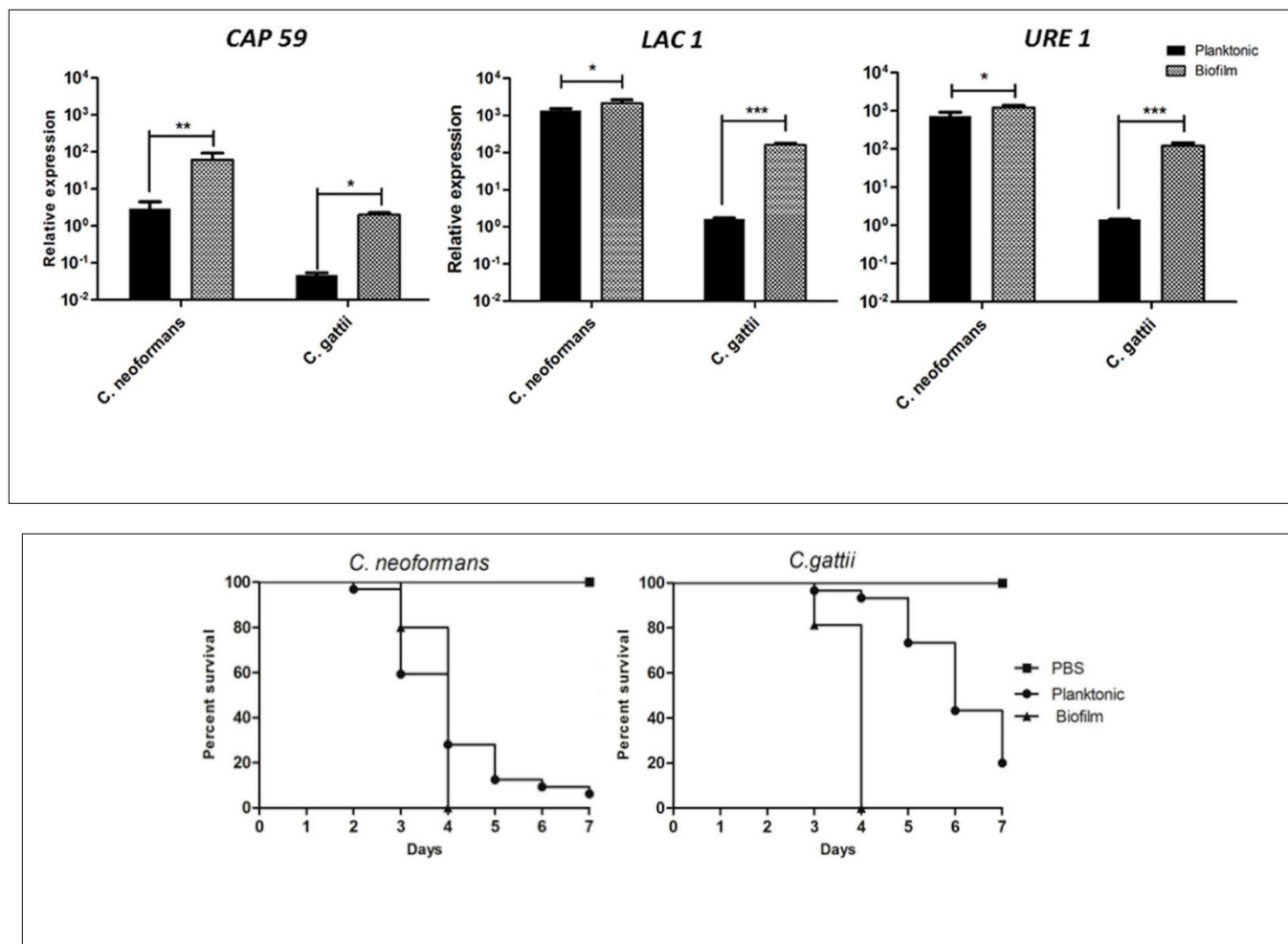
Amphotericin B activities increased 100X the fungicidal concentration for both species in biofilm condition. Our data corroborate to Martinez and Casadevall (2006a), since the authors showed a lower reduction in metabolic activity of *C. neoformans* biofilms when treated with the AMB in concentrations of 4 and 8 µg/mL, while for planktonic cells, the metabolic activity is reduced significantly after treatment with 0.5 µg/mL of AMB.

Additionally, our results demonstrated increased expression of the CAP59 gene in *C. neoformans* and *C. gattii* when compared the biofilm situations to the planktonic mode, suggesting that this gene may be related to the virulence of this infection. Although no studies of the CAP59 gene have been described in biofilms, the importance of this increased expression could be related to virulence and resistance because the presence of the capsule prevents the actions of both phagocytes and antifungal drugs. Few studies have been made of *C. gattii*; the genes that regulate virulence were therefore inferred from the work on *C. neoformans*. Several virulence factors were identified using *C. neoformans* as a model (Perfect, 2005). Some evidence of differences in the regulation of virulence genes between the two species have been published (Hicks and Heitman, 2007; Ngamskulrungraj et al., 2009). Our results demonstrated increased expression of CAP genes in the biofilms of *C. neoformans* and *C. gattii*. It has been reported that

C. neoformans requires four genes to form the capsule: CAP59, CAP64, CAP60, and CAP10 (Chang et al., 1996; Grijpstra et al., 2009). However, unencapsulated homologs of CAP10, CAP59, and CAP64 have been found in other fungi, suggesting that these genes may be involved in other processes (García-Rivera et al., 2004). CAP59 was the first gene that was directly related to the phenotype of the capsule and to virulence (Chang and Kwon-Chung, 1994), and it is present in all varieties of *C. neoformans* (Alspaugh et al., 1998). Del Poeta (2004) suggested that changes in the capsule structure could be related to responses to specific environmental conditions, with important implications for the host immune response (Del Poeta, 2004).

Our results also demonstrated an increased expression of laccase, due to expression of LAC1 gene, in the biofilms of *C. neoformans* and *C. gattii* compared to planktonic cells. Laccase, a phenoloxidase, was described by Zhu et al. (2001) in as an important virulence factor contributing to the protection of the fungus against oxidative damage by host phagocytes; it is located in the cell wall of *C. neoformans* (Zhu et al., 2001). The enzyme has also been described for *C. gattii* (Sorrell, 2001) and may also modulate the immune response and contribute to the spread of the disease to the CNS (Qiu et al., 2012).

Urease, codified by the gene URE1, is a metalloenzyme that catalyzes the hydrolysis of urea to ammonia and carbamate in physiological conditions and increases the pH. The importance of this enzyme was described in *Helicobacter pylori*, *Proteus mirabilis*, and its clinical significance was described in



C. neoformans, *C. gattii*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, *Trichosporon*, and *Aspergillus* species (Cox et al., 2000). The urease gene was expressed more in the biofilm condition in *C. neoformans* and *C. gattii* than in planktonic cells. Urease may promote the transmigration of the fungus across the blood-brain barrier and facilitate invasion of the CNS, indicating that urease activity can affect the interaction of the fungus with the endothelial cells and brain microcapillaries in the blood-brain barrier (Morrow and Fraser, 2013). Cox et al. (2000) suggested that urease activity in murine models increases the survival of mice infected with the mutant urease-negative gene (Cox et al., 2000), and Feder et al. (2015) demonstrated the importance of this enzyme in the virulence of *C. gattii*. In this work we emphasize, for the first time, the importance of these three genes in the biofilm condition (Feder et al., 2015).

Additionally, the importance of using alternative animal models in the study of virulence is increasing due to advantages such as the absence of ethical issues, cost, and the possibility of using a large number of individuals (Fuchs and Mylonakis, 2006; Desalermos et al., 2012). The use of *G. mellonella* in the study of *Cryptococcus* virulence is well documented (Fircative et al., 2014; Desalermos et al., 2015; Trevijano-Contador et al., 2015). Mylonakis et al. (2002) evaluated the virulence, host

immune responses and efficacy of antifungal compounds and considered the *G. mellonella* model suitable for *in vivo* studies of *C. neoformans* (Mylonakis et al., 2002). Fuchs et al. (2010) also described *G. mellonella* as an appropriate model for the study of this yeast (Fuchs et al., 2010) and Desalermos et al. (2015) studied *C. neoformans* and various genes involved in the yeast-host interaction in *C. elegans* and *G. mellonella* (Desalermos et al., 2015). Although insects and mammals are evolutionary distance, *G. mellonella* presents characteristics that support its use as *in vivo* model for fungal assays. The presence of at least six cellular type in hemolymph including phagocytic cells and the possibility of maintain *G. mellonella* at 37°C to simulate the mammalian temperature are important when considering the use of this alternative animal model in the study of human fungal disease (Kavanagh and Reeves, 2004; Fuchs and Mylonakis, 2006; Desalermos et al., 2012). Moreover, correlations have been found in mammals with respect to virulence and antifungal treatment (Mylonakis et al., 2005; London et al., 2006). Biofilm-producer and non-producer strains of *Candida albicans* were evaluated in *G. mellonella* and showed the biofilm-producer's high ability to kill larvae (Cirasola et al., 2013).

As part of the characterization of the biofilms of *Cryptococcus* sp., we evaluated the virulence these species in planktonic

and biofilm conditions in a *G. mellonella* model. The survival curve revealed that cells from biofilms are more virulent than planktonic cells, and this profile was also observed for

C. neoformans and *C. gattii*. Microorganisms are protected by the extracellular matrix in biofilms, which is mainly composed of glycoproteins and polysaccharides. In addition to conferring protection and resistance, our results showed that biofilm cells are more virulent and quickly cause death in *G. mellonella* larvae.

Wand et al. (2012) reported that *Acinetobacter baumannii* biofilms could produce higher rates of mortality in the *G. mellonella* model compared to planktonic cells of various clinical isolates. Cirasola et al. (2013) also observed the virulence of clinical isolates of *C. albicans* with or without biofilm capability; the survival of *G. mellonella* larvae following infection was reduced and 80% of the infected larvae died within 72 h.

Our studies revealed that *Cryptococcus* sp. yeast cells that underwent biofilm formation for the first-time were more virulent than cells that have not gone through the same process when analyzed in the *G. mellonella* model. Other virulence factors could be involved during biofilm formation that might help us to understand pathogenic infections in

G. mellonella. A study conducted by Uppuluri and Lopez-Ribot (2010) showed that cells that detach from a biofilm have a greater association with mortality than those from planktonic microorganisms. The dispersed cells of biofilms are more virulent and cause higher mortality than planktonic cells, which can be explained by epigenetic alterations within the cells that undergo biofilm development (Uppuluri and Lopez-Ribot, 2010; Sardi et al., 2014). Ramage et al. (2012) demonstrated an increased expression of aspartyl proteinases in *C. albicans* biofilms compared with planktonic cells. Their study reported that the production of proteinase by *C. albicans* established adhesion, invasion, and tissue destruction. Their results demonstrate that the expression of proteinases may be related to the severity of disease because the expression of these enzymes was significantly higher in mature biofilms (Ramage et al., 2012). *C. neoformans* also produces various proteases and aspartyl proteinases which have been proposed as potential virulence factors that contribute to host tissue invasion and colonization by the pathogen. The

increase in proteases could explain the premature death of the larvae infected with *C. neoformans* and *C. gattii* biofilms.

These preliminary results demonstrate the higher virulence of *C. neoformans* and *C. gattii* biofilms. Additional studies are needed to understand the virulence mechanisms of the biofilms involved in the premature death of the larvae.

These preliminary results demonstrate the higher resistance of AMB and virulence in *G. mellonella*, as well as increased expression of virulence genes of *C. neoformans* and *C. gattii* biofilms. Additional studies are needed to understand the virulence mechanisms of the biofilms involved in the premature death of the larvae.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed, have made substantial, direct and intellectual contribution to the work, and approved it for publication.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Rede Nacional de Métodos Alternativos – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (RENAMA-CNPq) 403586/2012-7; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (PADC/FCF).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.00290>

TABLE S1 | Primers used for RT-pPCR analysis for the virulence analysis.

TABLE S2 | Fungicidal concentration of amphotericin B for planktonic cells and biofilm mature of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*.

REFERENCES

- Albuquerque, P. C., Fonseca, F. L., Dutra, F. F., Bozza, M. T., Frases, S., Casadevall, A., et al. (2014). *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan fractions of different molecular masses are functionally distinct. *Future Microbiol.* 9, 147–161. doi: 10.2217/fmb.13.163
- Albuquerque, P. C., and Rodrigues, M. L. (2012). Research trends on pathogenic *Cryptococcus* species in the last 20 years: a global analysis with focus on Brazil. *Future Microbiol.* 7, 319–329. doi: 10.2217/fmb.11.162
- Alspaugh, J. A., Perfect, J. R., and Heitman, J. (1998). Signal transduction pathways regulating differentiation and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet. Biol.* 25, 1–14. doi: 10.1006/fgbi.1998.1079
- Bach, M. C., Tally, P. W., and Godofsky, E. W. (1997). Use of cerebrospinal fluid shunts in patients having acquired immunodeficiency syndrome with cryptococcal meningitis and uncontrollable intracranial hypertension. *Neurosurgery* 41, 1280–1282. doi: 10.1097/00006123-199712000-00008
- Banerjee, U., Gupta, K., and Venugopal, P. (1997). A case of prosthetic valve endocarditis caused by *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. *J. Med. Vet. Mycol.* 35, 139–141. doi: 10.1080/02681219780001031
- Bratton, E. W., El Hussein, N., Chastain, C. A., Lee, M. S., Poole, C., Stürmer, T., et al. (2012). Comparison and temporal trends of three groups with cryptococcosis: HIV-infected, solid organ transplant, and HIV-negative/non-transplant. *PLoS ONE* 8:e43582. doi: 10.1371/journal.pone.0043582
- Braun, D. K., Janssen, D. A., Marcus, J. R., and Kauffman, C. A. (1994). Cryptococcal infection of a prosthetic dialysis fistula. *Am. J. Kidney Dis.* 24, 864–867. doi: 10.1016/S0272-6386(12)80683-4
- Brizendine, K. D., Baddley, J. W., and Pappas, P. G. (2011). Pulmonary cryptococcosis. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 32, 727–734. doi: 10.1055/s-0031-1295720
- Brizendine, K. D., Baddley, J. W., and Pappas, P. G. (2013). Predictors of mortality and differences in clinical features among patients with cryptococcosis according to immune status. *PLoS ONE* 8:e60431. doi: 10.1371/journal.pone.0060431
- Casadevall, A., and Pirofski, L. (2001). Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J. Infect. Dis.* 184, 337–344. doi: 10.1086/322044
- Chang, Y. C., and Kwon-Chung, K. J. (1994). Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol. Cell. Biol.* 14, 4912–4919. doi: 10.1128/MCB.14.7.4912

- Chang, Y. C., Penoyer, L. A., and Kwon-Chung, K. J. (1996). The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans*, CAP64, is essential for virulence. *Infect. Immun.* 64, 1977–1983.
- Cirasola, D., Sciota, R., Vizzini, L., Ricucci, V., Morace, G., and Borghi, E. (2013). Experimental biofilm-related *Candida* infections. *Future Microbiol.* 8, 799–805. doi: 10.2217/fmb.13.36
- Corti, M., Priarone, M., Negroni, R., Gilardi, L., Castrelo, J., Arechayala, A. I., et al. (2014). Ventriculoperitoneal shunts for treating increased intracranial pressure in cryptococcal meningitis with or without ventriculomegaly. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 47, 524–527. doi: 10.1590/0037-8682-0176-2013
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., and Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711–745. doi: 10.1146/annurev.mi.49.100195.003431
- Cox, G. M., Harrison, T. S., McDade, H. C., Taborda, C. P., Heinrich, G., Casadevall, A., et al. (2000). Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect. Immun.* 68, 443–448. doi: 10.1128/IAI.68.2.443-448.2000
- Cox, G. M., Harrison, T. S., McDade, H. C., Taborda, C. P., Heinrich, G., Casadevall, A., et al. (2003). Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. *Infect. Immun.* 71, 173–180. doi: 10.1128/IAI.71.1.173-180.2003
- Del Poeta, M. (2004). Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 3, 1067–1075. doi: 10.1128/EC.3.5.1067-1075.2004
- Desalermos, A., Fuchs, B. B., and Mylonakis, E. (2012). Selecting an invertebrate model host for the study of fungal pathogenesis. *PLoS Pathog.* 8:e1002451. doi: 10.1371/journal.ppat.1002451
- Desalermos, A., Tan, X., Rajamuthiah, R., Arvanitis, M., Wang, Y., Li, D., et al. (2015). A multi-host approach for the systematic analysis of virulence factors in *Cryptococcus neoformans*. *J. Infect. Dis.* 211, 298–305. doi: 10.1093/infdis/jiu441
- Donlan, R. M., and Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167–193. doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002
- Feder, V., Kmetzsch, L., Staats, C. C., Vidal-Figueiredo, N., Ligabue-Braun, R., Carlini, C. R., et al. (2015). *Cryptococcus gattii* urease as a virulence factor and the relevance of enzymatic activity in cryptococcosis pathogenesis. *FEBS J.* 282, 1406–1418. doi: 10.1111/febs.13229
- Firacitive, C., Duan, S., and Meyer, W. (2014). *Galleria mellonella* model identifies highly virulent strains among all major molecular types of *Cryptococcus gattii*. *PLoS ONE* 9:e105076. doi: 10.1371/journal.pone.0105076
- Fuchs, B. B., and Mylonakis, E. (2006). Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 346–351. doi: 10.1016/j.mib.2006.06.004
- Fuchs, B. B. O., Brien, E., Khoury, J. B., and Mylonakis, E. (2010). Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence* 1, 475–482. doi: 10.4161/viru.1.6.12985
- García-Rivera, J., Chang, Y. C., Kwon-Chung, K. J., and Casadevall, A. (2004). *Cryptococcus neoformans* CAP59 (or Cap59p) is involved in the extracellular trafficking of capsular glucuronoxylomannan. *Eukaryot. Cell* 3, 385–392. doi: 10.1128/EC.3.2.385-392.2004
- Grijpstra, J., Gerwig, G. J., Wösten, H., Kamerling, J. P., and de Cock, H. (2009). Production of extracellular polysaccharides by CAP mutants of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 8, 1165–1173. doi: 10.1128/EC.00013-09
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., and Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 95–108. doi: 10.1038/nrmicro821
- Hicks, J. K., and Heitman, J. (2007). Divergence of protein kinase A catalytic subunits in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* illustrates evolutionary reconfiguration of a signaling cascade. *Eukaryot. Cell* 6, 413–420. doi: 10.1128/EC.00213-06
- Kavanagh, K., and Reeves, E. P. (2004). Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 101–112. doi: 10.1016/j.femsre.2003.09.002
- Kraus, P. R., Fox, D. S., Cox, G. M., and Heitman, J. (2003). The *Cryptococcus neoformans* MAP kinase Mpk1 regulates cell integrity in response to antifungal drugs and loss of calcineurin function. *Mol. Microbiol.* 48, 1377–1387. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03508.x
- Kronstad, J. W., Attarian, R., Cadieux, B., Choi, J., D'Souza, C. A., Griffiths, E. J., et al. (2011). Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 193–203. doi: 10.1038/nrmicro2522
- Kwon-Chung, K. J., Edman, J. C., and Wickes, B. L. (1992). Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 60, 602–605.
- Kwon-Chung, K. J., Polacheck, I., and Bennett, J. E. (1982). Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *J. Clin. Microbiol.* 15, 535–537.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- London, R., Orozco, B. S., and Mylonakis, E. (2006). The pursuit of cryptococcal pathogenesis: heterologous hosts and the study of cryptococcal host-pathogen interactions. *FEMS Yeast Res.* 6, 567–573. doi: 10.1111/j.1567-1364.2006.00056.x
- Martinez, L. R., Bryan, R. A., Apostolidis, C., Morgenstern, A., Casadevall, A., and Dadachova, E. (2006). Antibody-guided alpha radiation effectively damages fungal biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2132–2136. doi: 10.1128/AAC.00120-06
- Martinez, L. R., and Casadevall, A. (2005). Specific antibody can prevent fungal biofilm formation and this effect correlates with protective efficacy. *Infect. Immun.* 73, 6350–6362. doi: 10.1128/IAI.73.10.6350-6362.2005
- Martinez, L. R., and Casadevall, A. (2006a). *Cryptococcus neoformans* cells in biofilms are less susceptible than planktonic cells to antimicrobial molecules produced by the innate immune system. *Infect. Immun.* 74, 6118–6123. doi: 10.1128/IAI.00995-06
- Martinez, L. R., and Casadevall, A. (2006b). Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1021–1033. doi: 10.1128/AAC.50.3.1021-1033.2006
- Martinez, L. R., and Casadevall, A. (2015). Biofilm formation by *Cryptococcus neoformans*. *Microbiol. Spectr.* 3, 1–11.
- McClelland, E. E., Hobbs, L. M., Rivera, J., Casadevall, A., Potts, W. K., Smith, J. M., et al. (2013). The role of host gender in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* infections. *PLoS ONE* 8:e63632. doi: 10.1371/journal.pone.0063632
- Mendes-Giannini, M. J., Taylor, M. L., Bouchara, J. B., Burger, E., Calich, V. L., Escalante, E. D., et al. (2000). Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. *Med. Mycol.* 38, 113–123. doi: 10.1080/mmy.38.1.113.123
- Morrow, C. A., and Fraser, J. A. (2013). Is the nickel-dependent urease complex of *Cryptococcus* the pathogen's Achilles' heel? *MBio* 4:e00408–e00413. doi: 10.1128/mBio.00408-13
- Mylonakis, E., Ausubel, F. M., Perfect, J. R., Heitman, J., and Calderwood, S. B. (2002). Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 15675–15680. doi: 10.1073/pnas.232568599
- Mylonakis, E., Moreno, R., El Khoury, J. B., Idnurm, A., Heitman, J., Calderwood, S. B., et al. (2005). *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect. Immun.* 73, 3842–3850. doi: 10.1128/IAI.73.7.3842-3850.2005
- Ngamskulrungron, P., Himmelreich, U., Breger, J. A., Wilson, C., Chayakulkeeree, M., Krockenberger, M. B., et al. (2009). The trehalose synthesis pathway is an integral part of the virulence composite for *Cryptococcus gattii*. *Infect. Immun.* 77, 4584–4596. doi: 10.1128/IAI.00565-09
- Perfect, J. R. (2005). *Cryptococcus neoformans*: a sugar-coated killer with designer genes. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 45, 395–404. doi: 10.1016/j.femsim.2005.06.005
- Perfect, J. R. (2013). Fungal diagnosis: how do we do it and can we do better? *Curr. Med. Res. Opin.* 29, 3–11. doi: 10.1185/03007995.2012.761134
- Prates, R. A., Fuchs, B. B., Mizuno, K., Naqvi, Q., Kato, I. T., Ribeiro, M. S., et al. (2013). Effect of virulence factors on the photodynamic inactivation of *Cryptococcus neoformans*. *PLoS ONE* 8:e54387. doi: 10.1371/journal.pone.0054387
- Pyrgos, V., Seitz, A. E., Steiner, C. A., Prevots, D. R., and Williamson, P. R. (2013). Epidemiology of cryptococcal meningitis in the US: 1997–2009. *PLoS ONE* 8:e56269. doi: 10.1371/journal.pone.0056269
- Qiu, Y., Davis, M. J., Dayrit, J. K., Hadd, Z., Meister, D. L., Osterholzer, J. J., et al. (2012). Immune modulation mediated by cryptococcal caseinase promotes pulmonary growth and brain dissemination of virulent *Cryptococcus neoformans* in mice. *PLoS ONE* 7:e47853. doi: 10.1371/journal.pone.0047853

- Rajasingham, R., and Boulware, D. R. (2015). HIV care: ART adherence support and cryptococcal screening. *Lancet* 385, 2128–2129. doi: 10.1016/S0140-6736(15)60455-X
- Ramage, G., Rajendran, R., Sherry, L., and Williams, C. (2012). Fungal biofilm resistance. *Int. J. Microbiol.* 2012, 528521. doi: 10.1155/2012/528521
- Ramage, G., and Williams, C. (2013). The clinical importance of fungal biofilms. *Adv. Appl. Microbiol.* 84, 27–83. doi: 10.1016/B978-0-12-407673-0.00002-3
- Robertson, E. J., and Casadevall, A. (2009). Antibody-mediated immobilization of *Cryptococcus neoformans* promotes biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2528–2533. doi: 10.1128/AEM.02846-08
- Sardi, J. C., Pitangui, N. S., Rodríguez-Arellanes, G., Taylor, M. L., Fusco-Almeida, A. M., and Mendes-Giannini, M. J. (2014). Highlights in pathogenic fungal biofilms. *Rev. Iberoam. Micol.* 31, 22–29. doi: 10.1016/j.riam.2013.09.014
- Sardi, J. C., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., and Mendes-Giannini, M. J. (2013). *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J. Med. Microbiol.* 62, 10–24. doi: 10.1099/jmm.0.045054-0
- Scorzoni, L., de Lucas, M. P., Mesa-Arango, A. C., Fusco-Almeida, A. M., Lozano, E., Cuenca-Estrella, M., et al. (2013). Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. *PLoS ONE* 8:e60047. doi: 10.1371/journal.pone.0060047
- Smith, J. A., and Kauffman, C. A. (2012). Pulmonary fungal infections. *Respirology* 17, 913–926. doi: 10.1111/j.1440-1843.2012.02150.x
- Sorrell, T. C. (2001). *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med. Mycol.* 39, 155–168. doi: 10.1080/mmy.39.2.155.168
- Stie, J., and Fox, D. (2012). Induction of brain microvascular endothelial cell urokinase expression by *Cryptococcus neoformans* facilitates blood-brain barrier invasion. *PLoS ONE* 7:e49402. doi: 10.1371/journal.pone.0049402
- Tortorano, A. M., Dho, G., Prigitano, A., Breda, G., Grancini, A., Emmi, V., et al. (2012). EMM-FIMUA Study Group. Invasive fungal infections in the intensive care unit: a multicentre, prospective, observational study in Italy (2006–2008). *Mycoses* 55, 73–79. doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.02044.x
- Trevijano-Contador, N., Herrero-Fernández, I., García-Barbazán, I., Scorzoni, L., Rueda, C., Rossi, S. A., et al. (2015). *Cryptococcus neoformans* induces antimicrobial responses and behaves as a facultative intracellular pathogen in the non mammalian model *Galleria mellonella*. *Virulence* 6, 66–74. doi: 10.4161/21505594.2014.986412
- Uppuluri, P., and Lopez-Ribot, J. L. (2010). An easy and economical in vitro method for the formation of *Candida albicans* biofilms under continuous conditions of flow. *Virulence* 1, 483–487. doi: 10.4161/viru.1.6.13186
- Walsh, T. J., Schlegel, R., Moody, M. M., Costerton, J. W., and Salzman, M. (1986). Ventriculoatrial shunt infection due to *Cryptococcus neoformans*: an ultrastructural and quantitative microbiological study. *Neurosurgery* 18, 373–375. doi: 10.1097/00006123-198603000-00025
- Wand, M. E., Bock, L. J., Turton, J. F., Nugent, P. G., and Sutton, J. M. (2012). *Acinetobacter baumannii* virulence is enhanced in *Galleria mellonella* following biofilm adaptation. *J. Med. Microbiol.* 61, 470–477. doi: 10.1099/jmm.0.037523-0
- Williams, D. L., and Costerton, J. W. (2012). Using biofilms as initial inoculum animal models of biofilm-related infections. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 100, 1163–1169. doi: 10.1002/jbm.b.31979
- Williamson, P. R. (1994). Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *J. Bacteriol.* 176, 656–664.
- Wright, L. C., Payne, J., Santangelo, R. T., Simpanya, M. F., Chen, S. C., Widmer, F., et al. (2004). Cryptococcal phospholipases: a novel lysophospholipase discovered in the pathogenic fungus *Cryptococcus gattii*. *Biochem. J.* 384, 377–384. doi: 10.1042/BJ20041079
- Zaragoza, O., Rodrigues, M. L., de Jesus, M., Frases, S., Dadachova, E., and Casadevall, A. (2009). The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv. Appl. Microbiol.* 6, 133–216. doi: 10.1016/S0065-2164(09)01204-0
- Zhu, F., Ma, X. H., Qin, C., Tao, L., Liu, X., Shi, Z., et al. (2012). Drug discovery prospect from untapped species: indications from approved natural product drugs. *PLoS ONE* 7:e39782. doi: 10.1371/journal.pone.0039782
- Zhu, X., Gibbons, J., Garcia-Rivera, J., Casadevall, A., and Williamson, P. R. (2001). Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. *Infect. Immun.* 69, 5589–5596. doi: 10.1128/IAI.69.9.5589-5596.2001

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Benaducci, Sardi, Lourencetti, Scorzoni, Gullo, Rossi, Derissi, de Azevedo Prata, Fusco-Almeida and Mendes-Giannini. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.