



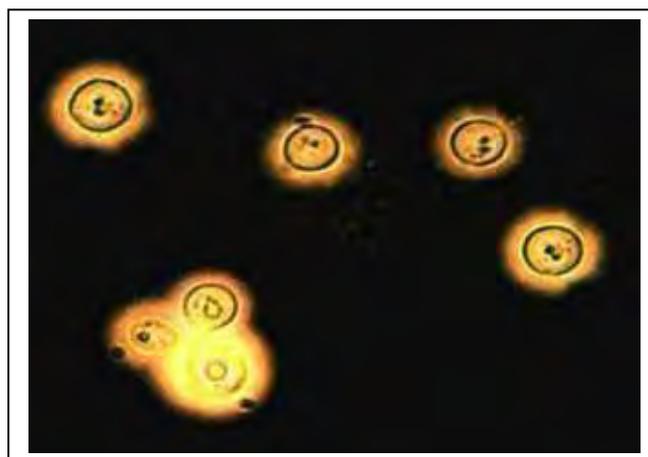
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



**“*Cryptococcus neoformans* DE FONTES  
AMBIENTAIS E BIOPROSPECÇÃO DE EXTRATOS  
DE PLANTAS COM ATIVIDADE SANEANTE”**

**Candidato:** José Nelson Martins Diniz

**Orientadora:** Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini



**Araraquara  
2009**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JOSÉ NELSON MARTINS DINIZ

**“*Cryptococcus neoformans* DE FONTES  
AMBIENTAIS E BIOPROSPECÇÃO DE EXTRATOS  
DE PLANTAS COM ATIVIDADE SANEANTE”**

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

**Orientadora: Profa. Dra. Maria  
José Soares Mendes-Giannini**

**ARARAQUARA  
2009**

*Ficha Catalográfica*  
**Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**Martins Diniz, José Nelson**

M385c      *Cryptococcus neoformans* de fontes ambientais e bioprospecção de extratos de plantas com atividade saneante. / José Nelson Martins Diniz. – Araraquara, 2009.  
138 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

Orientador: Maria José Soares Mendes Giannini

1. *Cryptococcus neoformans*. 2.RFLP. 3.Extratos vegetais. 4. Micologia.  
I. Giannini, Maria José Soares Mendes, orient. II. Título.

*CAPES: 40300005*

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Gel representativo dos produtos de PCR de isolados de *C. neoformans* obtidos com os iniciadores para *mating-type*  $\alpha$  e a... 61
- Figura 2. Perfis de PCR-RFLP de *C. neoformans* de fontes ambientais (gel a 3%). Marcador de tamanho molecular 100pb (Promega). **A** – Gel representativo das cepas padrão. **B, C** - Géis representativos das cepas de *C. neoformans* de fontes ambientais de Araraquara (VNI – sorotipo A)..... 62
- Figura 3. Antifungigrama pelo método de difusão em disco de 67 amostras ambientais de *C. neoformans*, realizado de acordo com o documento M44-A do CLSI. Classificação de acordo com a bula fornecida pelo fabricante. (CECON®)..... 66
- Figura 4. Distribuição dos valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de fluconazol para os 67 isolados ambientais de *C. neoformans* ..... 67
- Figura 5. Distribuição dos valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de extratos de *Alibertia macrophylla* e *Machaerium villosum* de isolados ambientais de *C. neoformans*..... 70
- Figura 6. Curva de sobrevivência da cepa padrão de *C. neoformans* (ATCC 90012) em relação ao tempo após exposição ao extrato vegetal de *A. macrophylla* 500  $\mu\text{g/mL}$  (1), ao fluconazol 32  $\mu\text{g/mL}$  (2), ao hipoclorito de sódio (controle negativo = 3) e sem exposição a nenhum agente (controle positivo = 4). A. Inóculo de  $10^8$ . B. Inóculo de  $10^4$ . C. Inóculo de  $10^2$ ..... 73
- Figura 7. Curva de sobrevivência das cepas padrão de *C. neoformans* (ATCC 90012) e de *C. parapsilosis* (ATCC22019) em relação ao tempo após exposição ao extrato vegetal de *A. macrophylla* 500  $\mu\text{g/mL}$  (1), ao fluconazol 32  $\mu\text{g/mL}$  (2), ao hipoclorito de sódio (controle negativo = 3) e sem exposição a nenhum agente (controle positivo = 4)..... 83

- Figura 8. Curva de sobrevivência das cepas ambientais de *C. neoformans* em relação ao tempo após exposição ao extrato vegetal de *A. macrophylla* 500 µg/mL (1), ao fluconazol 32 µg/mL (2), ao hipoclorito de sódio (controle negativo = 3) e sem exposição a nenhum agente (controle positivo = 4)..... 84
- Figura 9. Curva de sobrevivência das cepas ambientais de *C. neoformans* em relação ao tempo após exposição ao extrato vegetal de *A. macrophylla* 500 µg/mL (1), ao fluconazol 32 µg/mL (2), ao hipoclorito de sódio (controle negativo = 3) e sem exposição a nenhum agente (controle positivo = 4)..... 85
- Figura 10. Curva de sobrevivência das cepas ambientais de *C. neoformans* em relação ao tempo após exposição ao extrato vegetal de *A. macrophylla* 500 µg/mL (1), ao fluconazol 32 µg/mL (2), ao hipoclorito de sódio (controle negativo = 3) e sem exposição a nenhum agente (controle positivo = 4)..... 86
- Figura 11. Curva de sobrevivência das cepas ambientais de *C. neoformans* em relação ao tempo após exposição ao extrato vegetal de *A. macrophylla* 500 µg/mL (1), ao fluconazol 32 µg/mL (2), ao hipoclorito de sódio (controle negativo = 3) e sem exposição a nenhum agente (controle positivo = 4)..... 87
- Figura 12. Curva de sobrevivência das cepas ambientais de *C. neoformans* em relação ao tempo após exposição ao extrato vegetal de *A. macrophylla* 500 µg/mL (1), ao fluconazol 32 µg/mL (2), ao hipoclorito de sódio (controle negativo = 3) e sem exposição a nenhum agente (controle positivo = 4)..... 88
- Figura 13. Curva de sobrevivência das cepas ambientais de *C. neoformans* em relação ao tempo após exposição ao extrato vegetal de *A. macrophylla* 500 µg/mL (1), ao fluconazol 32 µg/mL (2), ao hipoclorito de sódio (controle negativo = 3) e sem exposição a nenhum agente (controle positivo = 4)..... 89
- Figura 14. Curva de sobrevivência dos isolados ambientais 57 e 61 de *C. neoformans* em relação ao tempo após exposição ao extrato

	vegetal de <i>A. macrophylla</i> 500 µg/mL (1), ao fluconazol 32 µg/mL (2), ao hipoclorito de sódio (3) e sem exposição a nenhum agente (controle = 4).....	90
Figura 15.	Curva de sobrevivência dos isolados ambientais de <i>C. neoformans</i> estudadas em relação ao tempo após exposição ao extrato vegetal de <i>A. macrophylla</i> 500 µg/mL, ao fluconazol 32 µg/mL, ao hipoclorito de sódio e sem exposição a nenhum agente.....	91
Figura 16.	Análise comparativa entre os diferentes isolados de <i>C. neoformans</i> frente ao tratamento com extrato <i>A. macrophylla</i> 500 µg/mL (A) e de fluconazol 32 µg/mL (B) nos tempos de T0 a T24 horas. 1= <i>C. neoformans</i> ATCC 90012, 2 ao 15: isolados de fonte ambiental selecionados (4,6,7,9, 11, 12, 23, 27, 30, 38, 39, 49, 57, 61) e 16 = <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019.....	93
Figura 17.	Análise comparativa entre os diferentes isolados de <i>C. neoformans</i> frente ao tratamento com hipoclorito de sódio (C), e sem exposição a nenhum agente (D) nos tempos de T0 a T24 horas. 1= <i>C. neoformans</i> ATCC 90012, 2 ao 15: isolados de fonte ambiental selecionados (4, 6, 7, 9, 11, 12, 23, 27, 30, 38, 39, 49, 57, 61) e 16 = <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019.....	94
Figura 18.	Variação do número de colônias dos isolados estudados (1 = ATCC 90012, 2 ao 15 = isolados ambientais selecionados (4, 6, 7, 9, 11, 12, 23, 27, 30, 38, 39, 49, 57, 61) e 16 = ATCC 22019) com exposição a diferente agentes no tempo inicial (A), e decorrida quatro horas de exposição (B).....	96
Figura 19.	Variação do número de colônias dos isolados estudados (1 = ATCC 90012, 2 ao 15 = cepas ambientais selecionadas (4, 6, 7, 9, 11, 12, 23, 27, 30, 38, 39, 49, 57, 61) e 16 = ATCC 22019) com exposição a diferente agentes decorrida 12 horas (C), e 24 horas de exposição (D).....	97

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1. Resultados dos testes de sensibilidade dos isolados de *C. neoformans* de fontes ambientais, *mating type*  $\alpha$  frente aos antifúngicos (Itraconazol, fluconazol, anfotericina B e cetoconazol) empregando a metodologia de difusão em discos de acordo com o documento M44-A do CLSI..... 64
- Quadro 2. Resultados dos testes de sensibilidade dos isolados de *C. neoformans* de fontes ambientais, *mating type*  $\alpha$  avaliados quanto à sensibilidade frente ao antifúngico fluconazol e aos extratos de *Alibertia macrophylla* e *Machaerium villosum* de acordo com o documento M27-A2 do CLSI. Dados expressos em  $\mu\text{g/mL}$ ..... 68
- Quadro 3. Resultado da análise da atividade saneante das cepas padrão (ATCC 22019) *C. parapsilosis*, (ATCC 90012) *C. neoformans* e ambientais de *C. neoformans*..... 75
- Quadro 4. Resultado da eficiência de desinfecção expressa em porcentagem de morte das cepas padrão e ambientais de *C. neoformans*..... 77
- Quadro 5. Dados e resultados da avaliação da atividade do extrato frente a cepa de *Cryptococcus neoformans* ATCC 90012 após incidência de luz, aumento de temperatura e a variação de pH, ao tampão utilizado no teste com pH Alcalino (Tris) e ainda da mesma cepa ATCC frente ao extrato e aos antifúngicos Fluconazol e Anfotericina B. Valores de CIM e CFM expressos em  $\mu\text{g/mL}$ ..... 98

## LISTA DE FLUXOGRAMA

Fluxograma. Análise da Atividade Saneante.....	57
--	----

# SUMÁRIO

RESUMO.....	13
INTRODUÇÃO.....	16
Histórico.....	16
Taxonomia e Características Gerais.....	17
Ecologia e Epidemiologia.....	21
Tipagem Molecular.....	30
Patogenia.....	33
Virulência.....	34
Cápsula Polissacarídica.....	35
Fenoloxidase (Lacase) e Melanina.....	36
<i>Mating Type</i> .....	37
Drogas Antifúngicas e teste de sensibilidade.....	38
Saneantes.....	42
Estudo de Extratos de Plantas Nativas.....	44
Justificativa.....	47
Objetivos.....	48
Metodologia.....	49
Seleção de Isolados.....	49
Exame microscópico.....	49

Identificação.....	49
PCR <i>Mating Type</i> .....	50
PCR <i>URA5</i> .....	51
Cepas de referência.....	52
Padronização espectrofotométrica do inóculo.....	52
Testes de Sensibilidade.....	52
Atividade saneante de extratos vegetais frente <i>C. neoformans</i> .....	55
Fluxograma.....	57
Análise Estatística.....	58
Ficiência de desinfecção e Estabilidade do extrato.....	59
Resultados.....	60
Determinação da <i>Mating Type</i> .....	61
PCR-RFLP- <i>URA5</i> .....	62
Sensibilidade Difusão em Agar.....	63
Sensibilidade Microdiluição.....	67
Padronização espectrofotométrica do inóculo.....	71
Atividade Saneante de extratos vegetais frente <i>C. neoformans</i> .....	71
Estabilidade do Extrato.....	98
Discussão.....	99
Conclusões.....	107
Referência Bibliográficas.....	108

*Dedico,*

*À meus Amados Pais pelo apoio e exemplo de amor, carinho e compreensão.  
Ao meu Filho "Netão" pela eterna fonte de força e inspiração.*

## *AGRADECIMENTOS*

*À Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini pela oportunidade e importante contribuição para minha formação profissional e acadêmica, pelos mais importantes ensinamentos sobre pesquisa além do carinho, paciência e atenção expressos.*

*A Profa. Dra. Karin Wertner e Profa. Dra. Márcia Nasser por colaborarem e disponibilizarem material para realização deste estudo.*

*Aos amigos Ana Marisa Fusco Almeida e Marcelo T. Matsumoto, Fernanda Sangalli e Elaine Toscano Miranda pela valiosa colaboração recebida no desenvolvimento deste trabalho.*

*A amiga Pati Rodella pela amizade, ajuda e incentivo nos momentos mais difíceis.*

*Aos amigos do dia-a-dia pela fraterna convivência no laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP de Araraquara, pelo apoio.*

*À Rosângela A. Moraes da Silva e Elaine T. Miranda, pessoas que passei a admirar no decorrer deste período.*

*Às “meninas” da Portaria, Luzia, Rita, Márcia e Angélica e Rosemira, que sempre expressaram com o “Bom Dia!” e “cadê o crachá?” que brincando estimulava o início de um bom dia.*

*À prof. Dra. Maria de Jesus Dutra dos Reis pela valiosa colaboração na parte estatística bem como valioso apoio em momentos difíceis.*

*Aos colegas de convivência na Unidade Saúde Escola – UFSCar, pela compreensão da minha busca por novos conhecimentos e melhoria da qualidade profissional.*

*À minha presente namorada “amorzinha” pelo apoio, companheirismo e compreensão pelas ausências para dedicação e constante estudo à realização deste trabalho.*

*Muito Obrigado!*

*“Mas uma coisa é certa: não existe mesmo um final para a seqüência de nossos atos. A cada dia somos convidados a conhecer uma paisagem diferente, que nos oferece a oportunidade de reunir – em nós mesmos – todo o Bem que formos aquinhoando durante nossas passagens pela Terra.*

*Os riscos que enfrentamos, os erros que cometemos tudo nos aponta para que sigamos escolhas mais justas no futuro. E ele não é apenas cheio de promessas de esperanças. Ele é a Luz brilhante e imaculada, suspensa sobre nossa cabeça, a nos iluminar no Todo - e não em parte -, a fim de que consigamos, enfim, o triunfo de Ser e Estar.*

*Nossa história tem a finalidade de fazê-los lembrar que o amanhã pode ser muito mais fértil do que o ontem, mas que o presente é que semeará a fertilidade que almejamos alcançar. Paz!”*

*Públio*

## RESUMO:

*Cryptococcus neoformans* é levedura capsulada saprobiota que acomete principalmente indivíduos com o sistema imunológico comprometido. Seu habitat está relacionado com algumas espécies de árvores, madeira em decomposição e fezes de pássaros, em especial de pombos do gênero *Columba livia*. Nas grandes cidades estas aves vêm causando diversos problemas devido a sua multiplicação intensa. Desta maneira, medidas saneantes serão de grande auxílio para controlar a população desta levedura. Assim, este estudo teve como objetivo reidentificar 67 isolados de *C. neoformans* de fontes ambientais e caracterizá-los quanto ao seu genótipo e perfil de sensibilidade aos antifúngicos anfotericina B, cetoconazol, itraconazol e fluconazol, utilizando o método da difusão em ágar seguindo o documento M44A e determinando a concentração inibitória mínima frente a fluconazol pelo método M27-A2, ambos preconizados pelo CLSI (*Clinical Laboratory Standard Institute*). Por outro lado, verificar o efeito antifúngico de extratos de plantas e sua atividade saneante em fezes de pombos comprovadamente contaminadas com isolado ATCC 90012 de *C. neoformans*. Todos isolados foram *Mating Type*  $\alpha$  e tipo VNI. Pelo método de microdiluição, 21% (14/67) dos isolados ambientais apresentaram sensibilidade diminuída ao fluconazol com CIM de 16  $\mu\text{g/mL}$  e mais de 50% (34/67) apresentaram CIM de 8  $\mu\text{g/mL}$ . O extrato de *Alibertia macrophylla* apresentou efeito saneante com índice de eficiência de mais de 80% após 24 horas, na grande maioria dos isolados de *C. neoformans*. Este extrato foi estável à incidência de luz, ao calor e variação de pH. Os nossos resultados são de grande valia para o desenvolvimento e utilização de

compostos ativos naturais no combate a *C. neoformans* no ambiente, abrindo possibilidade para sua utilização como saneante.

## **ABSTRACT**

*Cryptococcus neoformans* is a saprobite capsuled yeast that proliferates mainly in individuals who have the immunologic system compromised. Its natural habitat is related to some species of trees, decaying wood and bird excrement, in special *Columba livia* doves. In big cities, these birds have caused many problems due to its intense proliferation and the cleaning measures will be of great help in controlling this yeast. The aim of this study was to re-identify 67 *C. neoformans* isolates and characterize them according to their genotype and susceptibility to antifungal amphotericin B, cetoconazole, itraconazole e fluconazole, using the method of agar diffusion following the M44A document and determining the minimum inhibitory concentration to fluconazole by method M27-A2, both recommended by the CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute). On the other hand, the verification of the effect of plant extracts e and their cleaning activity on dove excrement previously contaminated with isolate ATCC 90012 of *C. neoformans*. All the isolates were *Mating Type*  $\alpha$  and VNI. For the microdilution method, 21% (14/67) of the environmental isolates showed decreased susceptibility to fluconazole with MIC of 16 mg/mL and more than 50% (34/67) had MICs of 8 mg/mL. The extract of *Alibertia macrophylla* presented clean effect with index of efficiency of 80% after 24 hours, in the great majority of *C. neoformans* isolates. This extract was stable to the light incidence, to the heat and variation of pH. Our results are of great use for the development and utilization of active natural compounds in the fight against *C. neoformans* from environmental and the study of other variables are necessary for the viability of its use as a domestic cleaner.

## **INTRODUÇÃO**

### **Histórico**

Em 1894, Otto Busse e Abraham Buschke relataram o primeiro caso de criptococose em uma paciente de 31 anos, que foi a óbito por infecção generalizada, com histórico de linfadenomegalia e lesão na tíbia. Busse, patologista, observou leveduras capsuladas em cortes histológicos e denominou-a *Saccharomyces hominis* e a infecção *Saccharomycosis hominis*. Neste mesmo ano, Francesco Sanfelice, na Itália, isolou uma levedura capsulada de suco de pêssago e no ano seguinte verificou sua patogenicidade em animais de laboratório. Lesões semelhantes a sarcomas foram observadas e acreditou que o isolado podia induzir tumores cancerígenos denominando-o de *Saccharomyces neoformans* (LITTMAN e ZIMMERMAN, 1956 apud CASADEVALL e PERFECT, 1998). Em 1895, na França, Curtis verificou o segundo caso de criptococose e nesta ocasião o agente foi denominado de *Saccharomyces subcutaneous tumefaciens* devido ao autor considerar a levedura diferente das obtidas por Sanfelice e a sua predileção por tecidos subcutâneos. Os isolados de Busse e Bushcke e Sanfelice foram renomeados por Vuillemin, em 1901, e denominados de *Cryptococcus hominis* e *Cryptococcus neoformans*, respectivamente. A transferência para o gênero *Cryptococcus* foi feita para diferenciá-lo de *Saccharomyces*, pois não formava ascósporos e não possuía habilidade fermentativa. O nome *Cryptococcus* é oriundo da palavra grega “Kryptos”, que significa escondido, secreto, obscuro, misterioso e em 1833 foi criado por Kutzing, para designar leveduras não produtoras de endósporos. Em 1916, Stoddard e Cutler observaram em parasitismo tecidual, áreas claras e confundiram a cápsula com lise celular ou tecidual, renomeando a levedura como *Torula histolytica*

A primeira metade do século XX marcou a consolidação de *C. neoformans* como levedura patogênica. *S. neoformans*, *Blastomyces neoformans*, *Cryptococcus hominis* e *Torula histolytica* foram alguns dos nomes utilizados para designar a levedura (MITCHELL e PERFECT, 1995). Em 1935, Benham identificou 22 isolados recuperados de humanos, de acordo com

a capacidade de fermentação, assimilação de fontes de carbono e nitrogênio e morfologia colonial. Os isolados obtidos por Busse, Curtis e Sanfelice foram agrupados dentro do gênero *Cryptococcus*. Continuando seus estudos, Benham, em 1950, propôs a denominação *Cryptococcus neoformans*, tanto para isolados ambientais como clínicos, para se referir à forma imperfeita da levedura, permanecendo a mesma terminologia após estudos realizados por Kurtzman e Fell (1998).

A criptococose, que até meados do século passado era rara, passou a ser doença de grande importância, principalmente pelo aumento do número de indivíduos imunocomprometidos, especialmente a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) e também associada a indivíduos transplantados, com linfomas e outras condições de imunossupressão (CHUCK e SANDE, 1989; POWDERLY, 1993). No entanto, há também descrições do aparecimento de casos da doença em pacientes sem nenhum imunocomprometimento (PAPPAS et al., 2001; ECEVIT et al., 2006). Várias formas podem ocorrer desde assintomáticas à doença patente (KWON-CHUNG et al., 1994; ROZEMBAUM e GONÇALVES, 1994; SABETTA e ANDRIOLE, 1985). O tropismo pelo sistema nervoso central (SNC) representa grande desafio à sobrevivência destes pacientes, com taxa de óbito variando mundialmente entre 10 e 20% e em alguns relatos no Brasil tem atingido índices muito mais elevados (ZUGER et al., 1986; KERKERING et al., 1981; PAPPALARDO e MELHEM, 2003; LEAL et al., 2008; LINDENBERG et al., 2008; PAPPALARDO et al., 2007)

### **Taxonomia e características gerais de *Cryptococcus neoformans***

O gênero *Cryptococcus* compreende um grupo com mais de 38 espécies. Possuem habilidade de produzir urease, assimilar inositol e D-glucuronato, não apresentam metabolismo fermentativo e reagem ao azul de diazônio B (KURTZMAN e FELL, 1998; CASADEVALL e PERFECT, 1998). A reprodução assexuada ocorre por brotamento de células globosas, ovaladas ou apiculadas. O crescimento em meio sólido apresenta coloração creme e comumente mucóide. As células apresentam cápsula formada por polissacarídeos, variando o seu tamanho de acordo com o isolado e fatores

ambientais que é facilmente observada em preparações com tinta da China ou nigrosina. Vários meios de cultura podem ser utilizados para o cultivo desta levedura, dada sua baixa exigência nutricional, necessitando de fontes simples de carbono e nitrogênio. Ágar Sabouraud e ágar BHI "*Brain Heart Infusion*" acrescido de antibacterianos são alguns dos meios mais utilizados para o seu cultivo em laboratório de rotina. Meios presuntivos como ágar niger e ágar L-dopa ou dopamina são utilizados na identificação presuntiva do agente. *C. neoformans* possui a enzima fenoloxidase, que oxida o ácido cafeico presente no ágar niger, resultando na formação de substâncias semelhantes à melanina, deixando as colônias de cor marrom (LACAZ et al., 2002).

Na identificação desta levedura, são observadas características como a presença de blastoconídios isolados ou múltiplos, presença de cápsula, assimilação de inositol, produção de urease e fenoloxidase. Para a identificação das espécies, deve-se utilizar provas de assimilação de fontes de carbono e de nitrogênio. A assimilação do inositol e de D-glucuronato caracteriza o gênero e provas de fermentação não são realizadas, pela inabilidade da levedura em fermentar carboidratos (KURTZMAN e FELL, 1998).

Geralmente, *C. neoformans* e *C. gattii* são encontradas na forma assexuada, com blastoconídios e a forma sexuada aparece com a formação de basidiósporos produzidos na extremidade de hifas por membros do filo Basidiomycota. *C. neoformans* foi subdividida em duas variantes: *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii*. Em 2002, KWON-CHUNG e colaboradores, comparando as seqüências de vários genes (URA5, CNLAC1, CAP59, CAP64, IGS e ITS de rRNA) de *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii* observaram diferenças filogenéticas com formação de "*clusters*" distintos, e uma análise mais aprofundada da estrutura genética das estirpes de *C. neoformans*, resultou na classificação de *C. neoformans* var. *gattii* para *C. gattii*.

Atualmente duas espécies são reconhecidas *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*. Raros são os relatos de infecção em humanos causados por outras espécies e estes são atribuídos, geralmente, a *Cryptococcus laurentii*, *C.*

*curvatus* e *C. albidus* e, na maioria dos casos, sem confirmação histológica (AVERBUCH, et al., 2002; GLUCK et al., 1987).

Os isolados também são classificados de acordo com o sorotipo, baseado em suas diferenças antigênicas do polissacarídeo capsular. Sorotipos A, D, e híbridos AD pertencem a *C. neoformans* e sorotipos B e C pertencem a *C. gattii*. *C. neoformans* sorotipo A está implicado em 99% dos doentes com criptococose associado a *AIDS* em todo o mundo, exceto na França, em que é responsável por cerca de 80% das infecções. Casos mais frequentes de sorotipo D e AD foram reportados na Europa, em que criptococose é associada com 77% dos doentes com HIV. Sorotipo A contribui para 51% dos casos de infecção seguida por *C. neoformans* sorotipo D (30%) e sorotipo AD (19%) (KWON-CHUNG e BENNETT, 1984; NISHIKAWA et al., 2003; IKEDA et al., 1982; BHATTACHARJEE et al., 1984; CHERNIAK e SUNDSTROM, 1994). Recentemente, três isolados atípicos foram obtidos de dois pacientes. Após análise por métodos fenotípicos, moleculares e por citometria, estes foram identificados como “*mating type*/sorotipo  $\alpha$ B/aD” (BOVERS et al., 2007).

*C. neoformans* e *C. gattii* pertencem à classe *Filobasidiella* das *Tremellales* (*Basidiomycota*, *Agaricomycotina*, *Tremellomycetes*). Estas espécies correspondem respectivamente às formas teleomorfas *F. neoformans* (KWON-CHUNG; 1974) e *F. bacillispora* (KWON-CHUNG, 1975).

O estado perfeito de *C. neoformans* foi descrito como *Filobasidiella neoformans* por Kwon-Chung (1975) e incluído na família *Filobasidiaceae*. No estado anamórfico, as duas variedades são morfologicamente similares, porém, no estado teleomórfico, os basidiosporos da variedade *neoformans* são esféricos, oblongos, elípticos ou cilíndricos, com paredes rugosas, enquanto os de *C. gattii* são baciliformes e com parede de aspecto liso (KWON-CHUNG, 1975; ELLIS e HOWARD, 1992; KREGER VAN RIJ, 1984).

Franzot et al, 1999, analisaram diferenças genotípicas entre os sorotipos A e D da variedade *neoformans*. Esta proposta baseou-se nos padrões de polimorfismo de DNA obtidos pela hibridização com sonda dos elementos repetitivos de *Cryptococcus neoformans* (CNRE-1) do DNA genômico e análise sequencial do gene URA-5, pela técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). As diferenças encontradas

foram suficientes para a separação do sorotipo A em uma nova variedade: *Cryptococcus neoformans* variedade *grubii*. Vários são os relatos descritos na literatura que diferem as variedades *neoformans* e *grubii* da espécie *C. gattii*. Os padrões de cariótipo eletroforético (WICKES et al., 1994; BOEKHOUT et al., 1997), os fornecidos pela técnica de RAPD “Random Amplification of Polymorphic DNA” (BOEKHOUT et al., 1997), pela técnica do *DNA-fingerprinting* (VARMA et al., 1995; MEYER et al., 1993, 1999 e 2003); pelas seqüências espaçadoras de DNA ribossômico (DIAZ et al., 2000); características fisiológicas e bioquímicas (BENNETT et al., 1978; POLACHEK e KWON-CHUNG, 1980; DUFAIT et al., 1987; KWON-CHUNG et al., 1987; CHERNICAK e SUNDSTROM, 1994); a suscetibilidade à toxina killer de *C. laurentii* (BOEKHOUT e SCORZETTI, 1997), seus habitats e também a distribuição geográfica (KWON-CHUNG e BENNETT, 1984; CASADEVALL e PERFECT, 1998).

No estágio sexual de *Filobasidiella neoformans* células de *mating type* opostos ( $\alpha$  e a) se fundem para formar um “*heterocarion*” que logo se desenvolve para formar hifas dicarióticas. Hifas com núcleos não fundidos e grampos de conexão típicos de basidiomicetos são originadas, seguido de divisões dos núcleos de forma sincronizada até a formação do basídio na extremidade da hifa. Ocorre então, a cariogamia seguida de meiose e esporogênese no ápice do basídio. Os quatro núcleos originados durante a meiose permanecem no basídio, enquanto mitoses repetidas pós-meiose geram quatro cadeias longas de até 40 esporos. Ao contrário de outros basidiomicetos, os esporos MAT $\alpha$  e MATa são distribuídos, aleatoriamente entre as quatro cadeias, na razão de 1:1 (KWON-CHUNG, 1975).

Estudos têm revelado que a migração nuclear durante o cruzamento não acontece de forma aleatória e sim organizada e unidirecional do MAT $\alpha$  para o MATa e que o DNA mitocondrial presente nos basidiósporos foi oriundo de um único tipo, MATa. Estes achados levaram os autores a proporem que células MAT $\alpha$  e MATa, embora morfológicamente indistinguíveis, possuem genes com funções distintas durante o cruzamento, com o MAT $\alpha$  exercendo papel de doador genético e o MATa de receptor genético (XU et al., 2000; McCLELLAND et al., 2004).

## Ecologia e epidemiologia

Em relação à ecologia desta levedura, vários estudos foram realizados relacionados a isolamentos de fontes ambientais no intuito de caracterizar sua distribuição em ecossistemas urbanos ou não, e entender melhor sua epidemiologia, biologia e patogenicidade (CASADEVALL e PERFECT, 1998). Em 1951, Emmons isolou *C. neoformans* de amostras de solo coletadas em Londres e posteriormente, os espécimes isolados do solo foram coletados de sítios contaminados com fezes de pombo (EMMONS, 1954). Em 1955, houve o estabelecimento da associação ecológica de *C. neoformans* com pombos (*Columba livia*), quando este foi isolado de 63 das 111 amostras de fezes, na Virgínia (EMMONS, 1955). A associação foi posteriormente confirmada por Kao e Schuwarz, (1957) e por Ajello, (1958), que verificou a presença de *C. neoformans* em 10 de 14 amostras de solos contaminados com fezes de pombo e outras aves (AJELLO, 1958). Na literatura há descrições de aves como canários, papagaios, pardais e frangos (STAIB, 1962; STAIB et al., 1984; BAWENS et al., 1986; SWINNE et al., 1986; SWINNE et al., 1988; CASADEVALL et al., 1992; GRISEO et al., 1995; LOPEZ-MARTINEZ et al., 1995; ABEGG et al., 2006). Estas fontes estão bem descritas na literatura (SWINNE-DESGAIN, 1975; ELLIS e PFEIFFER, 1990; PASSONI, 1998; BARONI et al, 2006).

Embora a ecologia de *C. neoformans* esteja classicamente relacionada aos pombos, o microrganismo não lhes causa infecção sistêmica, presumivelmente pela temperatura alta destas aves (40°C - 42°C). Swinne-Desgain, em 1976, mostrou que muitos pombos carregam *C. neoformans* no Inglúvio e que células permaneceram viáveis por até 86 dias, sugerindo importante papel destas aves no transporte desta levedura. Um caso de infecção ocorreu em pombo Beccari, limitando-se à área subcutânea periorcular, onde a temperatura pode ficar abaixo de 40° C (ENSLEY et al., 1979).

Adaptações bioquímicas favorecem a associação de *C. neoformans* var. *neoformans* com excretas de aves e permitem sua sobrevivência e

crescimento neste material. Em excretas dessecadas, *C. neoformans* conserva a viabilidade por quase dois anos e pode crescer em densidades de 30 a 60 milhões de organismos por mililitro (LITTMAN e BOROK, 1968). Filiú et. al. (2002) relataram que *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo A foi encontrado em concentrações de até 46000 propágulos viáveis por grama de material seco, refletindo a existência de fontes ambientais na forma de microfocos. Kwon-Chung (1991), analisando fezes de pombos, verificou que a alta concentração de creatinina exercia uma função seletiva contra bactérias e fungos saprobiotas. *C. neoformans* pode assimilar facilmente também ácido úrico, purinas e xantina, havendo provável adaptação bioquímica (LEVITZ, 1991; POLACHECK e KWON-CHUNG, 1980; KWON-CHUNG, 1991). Um fato interessante é que a variedade *gattii* não está associada a fezes de pombos, apesar de também possuir esta enzima, provavelmente, devido à diferença na regulação de sua via (KWON-CHUNG, 1976; POLACHECK e KWON-CHUNG et al., 1980).

Em estudo realizado por Rosario et al. (2005), amostras da cloaca de pombos foram analisadas para verificação da presença de *C. neoformans*. Além de outras espécies, a variedade *neoformans* foi encontrada em 1,8% das amostras. Em 2008, Rosário et al. confirmaram a relação de *C. neoformans* com pombos (*Columba livia*), mas também como saprobiota do tubo digestivo de outras aves, relacionando os excrementos destas como importante habitat às formas patogênicas da levedura.

*C. neoformans* foi isolado em várias partes do mundo, incluindo a África (AJELLO, 1956; REFAL et al., 1983), Ásia (HSU et al., 1994; PADHYE et al., 1993), Europa (MISHIRA et al., 1981; SWUINNE-DESGAIN, 1975), América do Norte (KOZEL e HERMERATH, 1984; POWELL et al., 1972) e América do Sul (RUIZ et al., 1989; LAZERA et al., 1993; BARONI et al., 2006) entre outras.

Em Bujunbura, Burundi, na Africa Central, *C. neoformans* var. *neoformans* foi isolado de poeira doméstica em 35% das residências de pacientes com *AIDS* que mantinham contato com aves (SWINNE et al., 1989; SWINNE et al., 1994). Pal (1997) analisou 28 amostras de fezes de pombos coletados em Kathmandu, Nepal, e sete foram positivas (25%) para *C. neoformans* var. *neoformans*.

Na região da Apulia (Itália) foram encontrados isolados de *C. neoformans* var. *neoformans*, *C. laurentii* e *C. albidus* em três cavernas de interesse arqueológico, em fezes de morcegos, de pombos, de raposas e em amostras de solo (MONTAGNA et al., 2003). Na região de Madras, Índia, 887 amostras de fezes de diferentes aves foram analisadas, sendo 106 positivas para *C. neoformans* (12%). A revelação de um fato novo e de grande importância foi o isolamento de *C. neoformans* de excrementos de corvos, ave ubíqua na Índia (GOKULSHANKAR et al., 2004).

No Rio de Janeiro Passoni et al. (1998) isolaram *C. neoformans* de poeira doméstica e de excretas de aves de cativeiro, como canários, periquitos e outros psitacídeos. Índices elevados de poeira domiciliar e de amostras do peridomicílio (13 a 50%) apresentaram contaminação com esta levedura. Na cidade de São Paulo, 38 locais da região central foram escolhidos para coletar amostras de fezes de pombos e fragmentos de árvores e em 10 locais (26,3%) foram isolados *C. neoformans* var. *neoformans* (MONTENEGRO e PAULA, 2000).

Ellis e Pfeiffer (1990) desvendaram o nicho ecológico de *C. gattii* associando-a com *Eucalyptus camaldulensis*, e relacionando a distribuição deste eucalipto com os casos de criptococose. Posteriormente, também foi isolada a partir de *Eucalyptus tereticornis*, na Costa do Ouro, Queensland, por Pfeiffer e Ellis (1992) e na Cidade do México por Licea et al. (1996). Mais tarde Pfeiffer e Ellis (1997) reconheceram mais três espécies de eucaliptos, *Eucalyptus rudis*, *Eucalyptus gomphocephala* e *Eucalyptus blakelyi* como hospedeiros naturais de *C. gattii*, na Austrália. Kidd et al. (2003) isolaram dois tipos moleculares de *C. gattii* (VGI e VGII) de insetos (ordem *Lepidoptera*; família *Oecophoridae*) presentes em uma única cavidade em árvores da espécie *E. tereticornis*, e mais recentemente, Kidd et al. (2007) estudando mecanismos de dispersão de *C. gattii*, relatam o isolamento desta levedura em Vancouver-Canadá, provenientes de amostras de diversas fontes, dentre elas, solo, água e ar, de locais onde havia grande tráfego de pessoas.

O primeiro isolamento ambiental de *C. gattii* sorotipo C na Colômbia, ocorreu a partir de fragmentos de árvores (*Terminalia catappa*) (CALLEJAS et al., 1998). Chakrabarty et al., (1997) e Mahmoud, (1999) isolaram respectivamente no Egito e na Índia, *C. gattii*, a partir de flores de *E.*

*camaldulensis*, já Halliday e Carter, (2003) obtiveram trinta isolados de *C. gattii* provenientes de 13 árvores de *E. camaldulensis* na Austrália. Embora a ecologia de *C. gattii* foi sempre associada a espécies de eucaliptos, Vilcins et al., (2002) relataram o isolamento a partir de outras árvores (*Syncarpia glomulifera* e outra não identificada) na Austrália. Neste País, a epidemiologia da espécie *gattii* foi extensamente estudada. A concentração de *E. camaldulensis* ao longo de cursos de rios e a associação de habitações rurais em áreas que abrigam estas árvores explicariam a alta prevalência de *C. gattii* nestes grupos. Este fato foi posteriormente confirmado, mostrando que na Austrália, casos humanos são significativamente comuns em áreas rurais e semi-rurais (CHEN et al., 2000).

*C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) também foi isolado de *Eucalyptus camaldulensis* em regiões de solo com elevada alcalinidade, na região do Mediterrâneo (ERGIN et al., 2004) e em diversas espécies de árvores usadas para enfeitar jaulas em zoológico, na Bélgica (BAUWENS et al., 2004). No começo deste século, 762 isolados ambientais coletados de três regiões dos EUA foram analisados. *C. neoformans* sorotipo A foi o mais prevalente (85,3%) seguido do sorotipo D (7,6%) e AD (7,1%) nenhum sorotipo B ou C foi encontrado e todos foram *mating type*  $\alpha$  (LITVINTSEVA et al., 2005). Na Malásia, de 544 excretas de aves coletadas de zoológico, *pet shops* e áreas públicas, 20 foram positivas para *C. neoformans*. Todos foram sorotipo A, MAT  $\alpha$  (TAY et al., 2005).

Fortes et al., (2001) isolaram *C. gattii* de ovos de *Guettarda acreana*, na floresta amazônica em áreas inexploradas pelo homem, no norte do país. Em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, foi realizado um estudo utilizando excretas de várias espécies de aves tais como canário belga (*Serinus canaria*), canário do reino (*Cordiulis cocullatos*), canário da terra (*Sicalis flaveola brasiliensis*), periquito australiano (*Melopsittacus unolulatus*), *Colopsitas* (*Psittacidae*), agapore (*Psittacidae*), mandarim (*Psittacidae*), pomba rabo de leque (*Columba sp*), pombo africano (*Columba sp*) e papagaio (*Psittacidae*). As amostras de fezes foram obtidas de lojas de aves, escolas, domicílios e de solos em ambientes abertos. Na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Filiú et. al., (2002) investigaram cativeiros de aves como fontes de *C. neoformans*. As excretas positivas pertenciam às espécies de

periquito australiano (*Melopsittacus unolulatus*), agapora (*Psittacidae*), pombo rabo de leque (*Columba sp*), canário belga e mandarim (*Serinus canaria*, *Psittacidae*). Os autores sugeriram que esta contaminação pode estar relacionada à forma de limpeza das gaiolas ou viveiros com a mesma ferramenta, e a grande disponibilidade de sementes de níger, painço, alpiste e girassol nos locais, que podem servir de substrato para o crescimento do fungo (FILIÚ et al., 2002).

Na cidade de Araraquara, no interior de São Paulo, foram estudadas as características fenotípicas e genotípicas de isolados de *C. neoformans* coletados de fezes de pombos em dois focos, primeiro e quinto andar, de um prédio do centro da cidade. Os isolados do primeiro andar foram mais heterogêneos quando comparados com os do quinto, sugerindo que a fonte e/ou o habitat que os pombos se expuseram foram distintos (ANDRADE, 2003). Raso et al., (2004) relataram um surto de criptococose em psitacídeos de um aviário em São Paulo. Da mesma forma, na cidade de Santos foram analisadas 116 amostras, sendo 79 de fezes de pombos e 37 do ar atmosférico do mesmo ambiente. Além de *C. neoformans* sorotipo A, isolados em 11 amostras (13,9%), outras espécies foram encontradas como *C. albidus* (12,6%) e *C. laurentii* (8,9%) (SOARES et al., 2005). Trinta e oito isolados de *C. neoformans* foram obtidos sendo 33 (87%) identificados como *C. neoformans* var. *grubii* e os cinco restantes (13%) como *C. gattii* (ABEGG et al., 2006). Baroni et. al., (2006), analisaram amostras coletadas de várias igrejas do Rio de Janeiro, incluindo fezes de pombos, amostras do ar e do solo e também de insetos. *C. neoformans* foi isolado de 37,8% das amostras de fezes (83/219) e em 4,93% (15/304) das amostras de ar, todos do sorotipo A.

Machado et al., em 1993 identificaram, através da história epidemiológica de 42 pacientes com quadro de criptococose, a fonte de infecção. Os pacientes tinham contato com pombos e a coleta de cinco amostras de solo dos locais indicados revelou positividade para *C. neoformans*. No mesmo ano, Lazera et al., (1993) isolaram ambas espécies na cidade do Rio de Janeiro. *C. neoformans* foi isolada a partir de fragmentos de árvores (*Syzygium jambolana*) e *C. gattii* de guano de morcego coletado em uma construção antiga. Lazera et al., (1996) demonstraram a colonização

de ocos de árvores vivas de diferentes gêneros (*Cassia grandis*, *Senna multijuga* e *Ficus microcarpa*) por esta levedura, sugerindo que esta pode estar relacionada ao processo de biodegradação da madeira, interagindo com microrganismos neste habitat e que não há especificidade do fungo por uma árvore hospedeira.

Na cidade de Teresina no estado do Piauí, Lazera et al., (1998) isolaram *C. gattii* sorotipo B repetidamente a partir do oco da árvore *Moquilea tomentosa*, um habitat natural diferente para esta variedade não relacionado às espécies de eucaliptos. Nesta mesma cidade, Lazera et al., (2000) isolaram ambas as espécies, *C. neoformans* e *C. gattii* de ocos de árvores, inclusive de um mesmo oco. Os relatos de isolamento de *C. neoformans* de árvores e madeiras em decomposição levantaram a questão sobre a possibilidade destas fontes, serem o possível nicho ecológico primário para a levedura (LAZERA et al., 1993, 1996, 1998 e 2000; RANDHAWA et al., 2001; ESCANDON et al., 2002; REIMÃO et al., 2007).

O isolamento do solo é mais raro e de acordo com Casadevall e Perfect (1998), podem refletir contaminação com excretas aviárias. Geralmente, o isolamento a partir do solo dá-se em baixos índices, fato que pode ser explicado também pelas condições anaeróbias, temperaturas altas, diminuição da umidade, incidência direto da luz, pH baixo e a presença de amebas no solo (LEVITZ, 1991).

Em relação a infecções em animais, que mantém contato com o ser humano, o primeiro caso no Brasil foi descrito por Dacorso Filho e Chagas (1957) em caprino. Em gato doméstico, a doença foi descrita pela primeira vez por Cruz et al. (1971). A criptococose em felino doméstico foi também descrita em um animal atendido no hospital Veterinário da UFRPE (Universidade Federal Rural de Pernambuco) que apresentava dificuldade respiratória, anorexia, tumoração na face próxima às narinas. Os cortes de tecidos corados pela hematoxilina eosina e ácido periódico de Schiff (PAS) revelaram estruturas fúngicas ovóides e arredondadas, de paredes delgadas com halo periférico compatíveis com *Cryptococcus* spp (SANTANA et al., 1999).

Na Espanha, Mandrioli et al. (2002) isolaram *C. neoformans* var. *grubbii* (*C. neoformans* sorotipo A) a partir de gato doméstico. Neste país,

Baró et al., (1999) isolaram *C. gattii* de cabra que morrera com sintomas respiratórios severos. Krohne (2000) isolou *C. neoformans* de cachorro que apresentava sinais clínicos da doença.

Neilson et al., (1978) estudaram o trato gastrointestinal de camundongos e observaram amebas de vida livre (*Acanthamoeba polyphaga*) fagocitando células de *C. neoformans*. *Acanthamoeba castellanii* tem a capacidade de fagocitar *C. neoformans* no solo e este de se replicar em seu interior. A replicação intracelular de *C. neoformans* nesta ameba foi acompanhada por acúmulo de vesículas contendo polissacarídeos semelhantes às descritas na infecção de *C. neoformans* em macrófagos, por ser patógeno facultativo intracelular. Amebas e macrófagos possuem algumas propriedades em comum relacionadas à forma de fagocitar. Ambos fagocitam partículas dentro de vacúolos e secretam enzimas lisossomais para digerí-las. Devido a estas semelhanças e à capacidade de *C. neoformans* em replicar dentro desta ameba, os autores sugeriram que os mecanismos usados por este fungo para parasitar macrófagos são selecionados no ambiente através do parasitismo e sobrevivência em amebas e outros predadores ambientais (STEENBERGEN et al., 2001).

A criptococose em sua forma disseminada é freqüentemente encontrada em pacientes com comprometimento do sistema imunológico. Possui distribuição mundial, onde o sorotipo A é o mais freqüente, seguido do sorotipo D, que apresenta prevalência significativa na Europa Central (DROMER et al., 1996; NURNBURG et al., 1989). Kwon-Chung e Bennett (1984) estudaram a epidemiologia de 628 isolados clínicos, constatando que 100% dos isolados da Áustria, França, Holanda, Itália, Japão e Alemanha eram da variedade *neoformans*.

Os pacientes portadores de *AIDS* representam a maioria dos casos de criptococose, sendo esta a principal causa micológica de morbidade e mortalidade, segundo Rozenbaum e Rios-Gonçalves (1994).

Na África, há alta prevalência de criptococose associada à infecção por HIV e portadores de *AIDS*. Estes indivíduos são freqüentemente expostos à variedade *neoformans* no seu próprio ambiente doméstico (LITVINTSEVA et al, 2007; SWINNE-DESGAIN et al, 1991).

Nos indivíduos sadios foi estimada prevalência de 0,2 casos anuais por milhão de pessoas (FRIEDMAN, 1983), enquanto que entre portadores de *AIDS*, os índices são de 6% a 10% nos EUA, Oeste Europeu, Austrália e 15 a 30% no continente Africano. Na África, há alta prevalência de criptococose associada à infecção por HIV e portadores de *AIDS* (CURRIE e CASADEVALL, 1994). Na Quinta Conferência de *Cryptococcus* e criptococose em Adelaide, em 2002, foi registrado o enorme impacto da doença em pacientes com *AIDS*, em particular para os que vivem no sul da África e no Saara. Nestas regiões, 30% dos pacientes com *AIDS* são infectados com o fungo e aproximadamente todos desenvolvem meningite criptocócica (BOEKHOUT, 2002; LITVINTSEVA et al, 2005; LONGLEY et al., 2008).

Steenbergen et al., (2000) analisaram 40 isolados clínicos de *C. neoformans* da cidade de Nova York, sendo que 85% e 12,5% estavam relacionados ao sorotipo A e D, respectivamente. Em algumas áreas geográficas como França, Itália e Dinamarca há prevalência do sorotipo D (BENNETT et al., 1984; DROMER et al., 1996; MITCHELL et al., 1995). Na França, o sorotipo D é causa de 21% dos casos de criptococose (DROMER et al., 1994; DROMER et al., 1996; DROMER et al., 2007). BARÓ et al., (1999) em um estudo sobre sorotipagem de 154 isolados de *C. neoformans* de origem clínica e ambiental, na Espanha, revelou que dos 115 isolados de origem humana de pacientes com *Aids*, 71 pertenciam ao sorotipo A, 33 ao sorotipo D e 11 ao sorotipo AD. Na Argentina, 123 isolados foram estudados, dentre os quais 85 pertenciam a pacientes com *AIDS* e o restante não foi especificado. Dos isolados, 89% eram do sorotipo A, 4% sorotipo D, 3% AD e 3% pertenciam ao sorotipo B. Os resultados mostraram maior associação da criptococose em pacientes com *Aids* com o sorotipo A (CANTEROS et al., 2002).

A espécie *gattii* possui distribuição geográfica restrita a áreas tropicais e subtropicais, incluindo a Austrália, Brasil, Havaí, Sul da Califórnia, México, Paraguai, Tailândia, Vietnã, Nepal e África Central (KWON-CHUNG e BENNETT, 1984). Nestas áreas, compreendem mais de 35% dos isolados clínicos. Todos os isolados são do sorotipo B, exceto no Sul da Califórnia, onde o sorotipo C foi também encontrado.

No Brasil, Nishikawa et al. (2003), estudaram os sorotipos de 467 isolados de *C. neoformans* de origem clínica e ambiental em que houve prevalência do sorotipo A (77,97%) em relação aos sorotipos B (18,2%), AD (1,3%), D (0,4) e C (0,2%). A epidemiologia do sorotipo A, nas regiões Sul e Sudeste, representa o quadro observado mundialmente. Em contraste, o sorotipo B é muito mais freqüente na região nordeste, ocorrendo igualmente em hospedeiros saudáveis tanto do sexo masculino como feminino.

Na cidade de São Paulo, de 84 isolados de *Cryptococcus* analisados, 75 foram classificados como pertencendo a variedade *grubii*, e oito à espécie *gattii* (OHKUSU et al., 2002). Já em estudo no Hospital de Doenças Tropicais de Goiânia, isolados de 50 pacientes com criptococose meningoencefálica associada a Aids, Fernandes et. al., (2000) demonstraram que apesar de haver predominância de *C. neoformans* em pacientes com AIDS (47/50), *C. gattii* pode também ser encontrada neste grupo de pacientes (3/50).

Na cidade de Belém, no estado do Pará, 19 casos foram relatados de criptococose em crianças, com idade entre 5 a 13 anos, e a espécie *C. gattii* foi isolada em nove destas (CORREA et al., 1999). Em Santa Maria, Rio Grande do Sul, no período de 1961 a 1995, oito casos de criptococose foram relatados não associados a AIDS, em que o único isolado pertencente à espécie *C. gattii* era procedente de indivíduo que habitava zona rural (LOPES et al., 1997). No Brasil, a infecção por *C. gattii* é endêmica, especialmente no nordeste e 75% de todos os isolados pertencem ao sorotipo B (NISHIKAWA et al., 1999). Os poucos casos de criptococose causados pelo sorotipo C foram relatados principalmente nos EUA, seguindo-se Europa, Colômbia, Argentina e Brasil (CALLEJAS et al., 1998).

Na região de Araraquara e Ribeirão Preto, pelos dados levantados pela Vigilância Epidemiológica a grande maioria de casos de criptococose associado a AIDS, evoluiu para óbito e a taxa de mortalidade da região de Araraquara variou entre 33,3 a 80% (BARBIERI, 2000). Moreira et al., (2006) relataram que, em Uberlândia, 72,9% de 96 pacientes com criptococose, em particular os portadores do HIV, evoluíram para óbito, mesmo tratados com anfotericina B e derivados triazólicos. Leal et al., (2008) realizaram um estudo retrospectivo no período entre 2000 a 2005 analisando dados como raça, gênero idade e fatores de risco como infecção por HIV. Dos 126 pacientes

que desenvolveram meningite criptococcica, 77% foram homens com idade entre 30 e 39 anos, 95% infectados pelo HIV.

Estudos moleculares são utilizados para ajudar na maior compreensão do fungo e seu comportamento. Na última década, grande número de técnicas de tipagem molecular foi utilizado em estudos epidemiológicos de *C. neoformans*. Estas técnicas incluem cariotipagem, RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), hibridização do DNA, AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e PCR *fingerprinting* (BRANDT et al., 1995; VARNA e KWON-CHUNG, 1992; CASADEVALL e PERFECT, 1998; ALMEIDA et. al., 2007).

## TIPAGEM MOLECULAR

A tipagem molecular é potencialmente útil em determinar casos de recidiva ou reinfecção, demonstrando os graus de relação entre os isolados no início e em infecções posteriores de um mesmo paciente. Várias técnicas moleculares são empregadas na caracterização de agentes patogênicos e dentre estas, o *PCR-fingerprinting* e RAPD são freqüentemente usadas com sucesso para tipagem de leveduras como *C. neoformans* (MEYER et al., 1999 e 2003; HORTA et al., 2002; CASALI et al., 2003; IGREJA et al., 2004; NGAMWONGSATIT et al., 2005).

Em estudos de genotipagem com a técnica de AFLP, Boekhout et al. (2001) avaliaram 207 isolados de *C. neoformans* de origem clínica, veterinária e ambiental, de vários continentes. Seis “clusters” principais foram identificados, três abrangendo isolados de *C. neoformans* var. *neoformans/grubii* (sorotipo D e A) e os três restantes da espécie *C. gattii* (sorotipo B e C).

A técnica de AFLP detecta polimorfismos de DNA em sítios de enzimas de restrição específicos e permite que estes polimorfismos sejam detectados em sítios de restrição múltiplos independentes simultaneamente. É aplicável na detecção de variações de DNA de qualquer origem e complexidade sem conhecimento prévio da seqüência (MASIGA et al., 2000). A análise por AFLP

é baseada na ligação de adaptadores aos fragmentos de restrição genômicos seguido de uma amplificação por PCR com “primers” adaptadores-específicos e requer apenas uma pequena quantidade de DNA genômico purificado, que é digerido com duas enzimas de restrição. Este método combina aplicabilidade universal com grande poder de discriminação e reprodutibilidade e foi empregado tanto em estudos taxonômicos como diagnósticos e epidemiológicos (SAVELKOUL et al 1999).

No Brasil, Trilles et al. (2003) analisaram padrões por AFLP de isolados clínicos e ambientais obtidos de fragmentos de árvores e verificaram grau alto de relação entre os isolados. A ocorrência do genótipo 6 (= VGII de Meyer, 2003) entre os isolados clínicos e ambientais tem chamado a atenção por atingir pacientes imunocompetentes e por estar implicado em um surto no Hospital em Vancouver Island, Canadá (TRILLES et al., 2003; BARRETO de OLIVEIRA et al., 2004; HOANG et al., 2004).

A técnica de RAPD consiste, basicamente, na amplificação de fragmentos de DNA por PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando iniciadores aleatórios a uma temperatura baixa de anelamento (36°C a 45°C), permitindo que iniciador se anele em diversos locais ao longo das duas fitas de DNA, gerando fragmentos de vários tamanhos que são separados e caracterizados por eletroforese em gel de agarose (WILLIAMS et al., 1990 e 1991). A tipagem molecular com o uso de RAPD, além de ser uma técnica simples e rápida, tem a vantagem de prescindir do conhecimento prévio da seqüência do DNA em estudo, podendo ser utilizados iniciadores universais de 10 a 16 nucleotídeos (SWAMINATHAN e MATAR, 1994).

Na padronização do RAPD realizada por Meyer et al. (1999) a tipagem de *C. neoformans* teve a finalidade de permitir o estudo epidemiológico global de cepas em diversos laboratórios de vários países. Em relação a *C. neoformans*, um dos primeiros trabalhos utilizando RAPD foi realizado por Crampin et al (1993), que demonstraram que cada isolado gerou um perfil diferente que parecia não estar relacionado ao sorotipo.

Na região de Nagasaki, isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) foram examinados por RAPD, utilizando três iniciadores randômicos (R28, OPH-02 e OPH-20). Os perfis obtidos revelaram seis padrões entre isolados clínicos e três padrões entre os

ambientais. O padrão I foi o mais comum (18 entre 29 isolados) e foi encontrado em toda a região de Nagasaki. Dois isolados ambientais revelaram padrões de RAPD idênticos (padrões I e IV) aos dos pacientes, sugerindo que isolados clínicos e ambientais pertenciam ao mesmo “pool” de isolados de *C. neoformans* (YAMAMOTO et al., 1995).

Em estudo de 27 isolados clínicos e 10 ambientais provenientes do Rio Grande do Sul foi investigada a diversidade genética por RAPD. Vinte e dois iniciadores aleatórios foram testados, dos quais oito confirmaram o polimorfismo, enquanto três agruparam a maioria dos isolados clínicos dentro de um único subgrupo (HORTA et al., 2002). Recentemente, 83 isolados clínicos de várias regiões do Estado de São Paulo foram tipados por cariotipagem eletroforética e RAPD onde 22 e 15 perfis foram encontrados, respectivamente. Ainda neste estudo foi evidenciada mudança de perfis de cariótipo e RAPD associados ao aumento da concentração inibitória mínima frente às principais drogas utilizadas para o tratamento em isolados seqüenciais de um mesmo paciente sugerindo microevolução (ALMEIDA et al., 2007).

Meyer et al., (1999 e 2003), em um estudo multicêntrico global, utilizaram a técnica de *PCR-fingerprinting* com o intuito de avaliar a estrutura genética de *C. neoformans* em mais de 400 isolados clínicos e ambientais. Oito grupos principais foram encontrados; VNI e VNII (*C. neoformans* var. *grubii* sorotipo A), VNIII (sorotipo AD), VNIV (var. *neoformans* sorotipo D) e VGI-VGIV (*C. neoformans* var. *gattii* sorotipo B e C). Mais tarde, Meyer et al. (2003) estenderam o trabalho para outras partes do mundo aplicando além do *PCR-fingerprinting*, a técnica de RFLP utilizando o gene URA-5. Ambas as técnicas agruparam os isolados nos mesmos oito grupos previamente estabelecidos e o tipo VNI mostrou-se mais prevalente entre os isolados.

No sul do Brasil, 38 isolados ambientais foram tipados pelas técnicas de *PCR-fingerprinting* com os iniciadores M13 e (GACA)<sub>4</sub> e cariotipagem eletroforética. Trinta e três dos 38 isolados foram identificados como VNI (*C. neoformans* var. *grubii*) e os cinco restantes como VGI (*C. gattii*) (ABEGG et al., 2006). Recentemente, 47 isolados clínicos de *C. neoformans* de várias regiões do Estado de São Paulo foram avaliados quanto aos sorotipos e ao “mating-type” por PCR. A diversidade genética foi analisada por *PCR-*

*fingerprinting* com a seqüência iniciadora específica para regiões microssatélite (GACA)<sub>4</sub>, RAPD com o iniciador OPJ6 e por RFLP do gene PLB1. A maioria dos isolados pertenceu ao tipo molecular VNI (45/47) e apenas dois foram VNII quando analisados por *PCR-fingerprinting* e PCR-RFLP. Alta homogeneidade foi obtida com o iniciador (GACA)<sub>4</sub>, e a maioria dos isolados apresentou grande correlação (> 0.9). Os resultados do RAPD, por sua vez, revelaram maior heterogeneidade com número maior de perfis moleculares. Pela técnica de PCR-RFLP, nenhum tipo molecular novo foi encontrado, realçando a idéia de que em genes conservados como PLB1, as diferenças podem ser resultantes de divergências evolutivas dentro do complexo *C. neoformans* (MATSUMOTO et al., 2007). Hanafy et al., (2008) utilizando o método de tipagem molecular multilocus microssatélite com sondas específicas CNG1, CNG2 e CNG3 amplificou o loci 15 SSR e 12SSR de *C. neoformans* var. *grubii*, *C. neoformans* var. *neoformans* e de um híbrido AD, mas não de *C. gattii* sugerindo uma associação espécie-específica. Com este trabalho, foi evidenciado que a utilização destes três microssatélites polimórficos pode ser de grande valia na genotipagem de cepas, na análise de populações genéticas, em estudos epidemiológicos e ainda ajudar no diagnóstico da criptococose.

## **PATOGENIA**

A via respiratória é a principal porta de entrada para que este fungo ambiental infecte e cause doença no homem (KWON-CHUNG et al., 1992; CRISSEY et al., 1995; BUCCHANAN e MURPHY, 1998). Os propágulos de *C. neoformans* são inalados e podem atingir os alvéolos pulmonares do hospedeiro. Na árvore brônquica, partículas maiores que 5 µm são retidas e acredita-se que os propágulos potencialmente infecciosos são leveduras ressecadas ou basidiósporos, em torno de 3 µm de diâmetro (ZIMMER et al., 1984). Após atingirem os alvéolos pulmonares, dissemina-se por via hematogênica (CURRIE et al., 1994), desencadeando infecção regressiva subclínica ou doença.

O quadro clínico mais freqüente de criptococose é a meningoencefalite, seguindo-se pneumonia e, com menos freqüência, lesões de pele. Quando o sistema nervoso central é atingido, pode ocorrer óbito, devido ao aumento da pressão intracraniana, com redução do sangue local circulante (PERFECT, et al., 1989; CRISSEY et al., 1995).

Segundo Kohno, (1999) a criptococose pulmonar é menos comum que a cerebral, e é classificada como primária ou secundária de acordo com a doença de base. A primária ocorre em qualquer parte do pulmão, bilateral ou não, envolvendo a base ou área média pulmonar, simulando infecção do tipo influenza e pode resolver-se espontaneamente (MITCHEL, 1983). A forma secundária pode atingir indivíduos com diabetes, doenças renais e hematológicas malignas.

Formas extrapulmonares da criptococose ocorrem em indivíduos imunossuprimidos por diversas condições, dentre as quais: *AIDS*, colagenoses (uso de corticosteróides e outros agentes imunossupressores), diabéticos, portadores de neoplasias malignas e pacientes transplantados (com uso de imunossupressores). As localizações mais freqüentes são rins, ossos, sistema nervoso central e pele, sendo esta última acometida em 6 a 16% dos casos. Existem, contudo, relatos de casos de criptococose extrapulmonar em pacientes aparentemente imunocompetentes e o agente etiológico mais freqüentemente encontrado nestes casos é *C. gattii*, tido como fungo patógeno primário (CASADEVAL e PERFECT, 1998). Embora atue como patógeno, é provável que este encontro com o homem seja acidental, não sendo este seu nicho primário (BOVERS et. al., 2008).

## **VIRULÊNCIA**

A capacidade de crescimento a 37°C, produção de melanina, cápsula polissacarídica, *mating type*, enzimas e moléculas de sinalização celular são fatores de virulência identificados, mas não plenamente compreendidos, tidos como importantes para a patogenia de *C. neoformans*, que lhe possibilitam êxito quando em vida parasitária (CASADEVALL e PERFECT, 1998; CLANCY et al., 2006).

## **Cápsula Polissacarídica**

Há evidências de que a cápsula, uma estrutura dinâmica e elaborada que rodeia a parede celular, única entre os fungos que infectam o homem, é um fator chave na virulência de *C. neoformans*. A cápsula parece exercer papel importante na proteção da levedura contra a dessecação e ingestão por amebas do solo (NIELSON et al., 1978; STEENBERGEN et al., 2001; CASADEVALL et al., 2003). A observação de que cepas capsuladas foram capazes de sobreviver à fagocitose e de se replicar em *Acanthamoeba castellanii*, ao contrário de sua mutante, levaram os autores a sugerirem que a virulência de *C. neoformans* foi resultante de adaptações contra predadores do meio ambiente, presentes no solo e em vegetações (STEENBERGEN et al., 2001; CASADEVALL et al., 2003). Bulmer et al., (1990) verificaram que seis mutantes de *C. neoformans* acapsulados, avirulentos, mas originários de cepa capsulada reverteram para o estado capsulado, apresentando graus variados de virulência. Fromtling et al., (1982) observaram que cepas mutantes acapsuladas são menos virulentas que as selvagens capsuladas, fato também observado por Chang e Kwon-Chung, (1994). Cápsulas pequenas foram observadas quando esta levedura estava no ambiente e cápsulas espessas durante a fase parasitária evidenciando que este fungo determina genotipicamente e de acordo com as condições de crescimento oferecidas o tamanho da mesma (MITCHELL & PERFECT, 1995). A cápsula é constituída por glucuronoxilomanana (GXM), galactoxilomanana, e manoproteínas (CHERNIAK et al., 1995).

As diferenças na estrutura molecular da glucuroxilomanana geram diferenças antigênicas que fornece as bases para separação dos isolados de *C. neoformas* nos cinco sorotipos (A, B, C, D e AD) (CHERNIAK et al., 1995; IKEDA et al., 1982).

A cápsula tem quatro genes responsáveis por sua síntese e virulência, identificados e caracterizados em camundongos: CAP64, CAP60, CAP59 e

CAP10 (CHANG e KWON-CHUNG, 1994; CHANG et al., 1996; CHANG e KWON-CHUNG, 1998).

### **Fenoloxidase (Lacase) e Melanina**

Melanina é um pigmento carregado negativamente, catalisado pela enzima fenol-oxidase, categorizada como uma lacase que promove polimerização oxidativa em compostos fenólicos (WILLIAMSON, 1997).

A lacase catalisa a reação de oxidação da L-DOPA, formando um composto intermediário altamente reativo, a dopaquinona. Esta, na ausência de grupos tióis, forma o leucodopacromo, que é então oxidado a dopacromo. Na etapa seguinte, ocorrem hidroxilação e decarboxilação formando a melanina (OZEKI et al., 1997a; OZEKI et al., 1997b; WILLIAMSON et al., 1998).

Vários trabalhos foram desenvolvidos com o objetivo de esclarecer a biossíntese da melanina e sua relação com a patogenicidade de *C. neoformans*. Células de *C. neoformans* melanizadas são menos suscetíveis aos efeitos dos oxidantes derivados de oxigênio, e nitrogênio, anfotericina B, caspofungina e luz ultravioleta (VAN DUIN et al., 2002; WANG e CASADEVALL, 1994).

Outra função proposta é a mudança de carga na superfície celular, levando a interferência na fagocitose (WANG et al., 1995). Huffnagle et al., (1995) verificaram que cepas que produziam grandes quantidades de melanina inibiam a produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), que é uma das principais moléculas sinalizadoras na resposta inflamatória mediada por células T, envolvida no recrutamento e ativação de neutrófilos. Estudos demonstraram que a presença da lacase foi significativa para a virulência deste fungo em animais (WILLIAMSON, 1997). A lacase protegeria as células de *C. neoformans* de processos oxidativos provocados pelos macrófagos alveolares (LIU et al., 1999).

Culturas de *C. neoformans* que se desenvolvem na presença de precursores adquirem a coloração marrom. A melanização pode ser usada para identificação dos isolados, colônias que se desenvolvem em meio de

cultura que contém extrato da semente *Guizotia abyssinica* crescem na cor marrom, pois ocorre a oxidação do ácido caféico utilizado como substrato por *C. neoformans* (STAIB et al., 1987).

O neurotropismo de *C. neoformans* é explicado em parte pela habilidade do fungo em usar alguns neurotransmissores como epinefrina e dopamina como substratos para produção de melanina. Estudos usando peptídeos melanina-específicos e anticorpos monoclonais ligantes à melanina demonstraram em tecidos humanos e de roedores que o fungo produz o pigmento *in vivo* (NOSANCHUK et al., 1999).

### ***Mating type***

O locus *mating-type* é a região genômica que regula o ciclo sexual desta levedura, pode ser diferente entre células de *mating-type* opostos possibilitando ocorrência de reprodução sexuada quando células de *mating-types* opostos se encontram. A limitação de nutrientes é um importante fator para a ocorrência deste cruzamento. Na ausência de nitrogênio as células *MATa* produzem o feromônio MFa e, em resposta a esse feromônio, as células *MAT $\alpha$*  formam um tubo de conjugação. Através da conjugação, hifas dicarióticas com grampos de conexão são produzidas, basídios terminais são formados, ocorre cariogamia, meiose, mitose e então a germinação dos basidiósporos em leveduras (KWON-CHUNG et al. 1992).

A partir de duas cepas de *C. neoformans*, diferentes quanto ao *mating-type*, Kwon-Chung et al. (1992) demonstraram que o tipo  $\alpha$  é mais virulento que o tipo a, *C. neoformans* sorotipo D, ao sofrer rompimento do gene STE 12  $\alpha$  tornou-se menos virulento em modelo murino, sendo a virulência restaurada com a reconstituição do gene que somente existe no *mating type*  $\alpha$ . Dados de sequenciamento de cepas congênicas de *C. neoformans* sorotipo D revelaram que o comprimento do locus *MAT $\alpha$*  é superior a 100kB enquanto de *MATa* é em torno de 120kB. (KAROS et al., 2000; LENGELER et al., 2002; McCLELLAND et al., 2004).

Carvalho et al., (2007) verificando a presença de *C. neoformans* em fezes de pombos de uma área rural de Alfenas – MG, isolou esta levedura e determinou o sorotipo e o *mating type* por PCR multiplex, simultaneamente.

Eles caracterizaram as amostras como sendo do sorotipo A e *MAT*  $\alpha$  e evidenciam o PCR multiplex como uma boa alternativa na sorotipagem, com baixos custos e pela detecção de forma simultânea do sorotipo e do *mating type*. Escandón et al., (2007) estudando as habilidades de cepas colombianas se acasalarem com outras do tipo oposto, observaram esta ocorrência em 27,3% nos isolados sorotipo A e em 46,2% dos isolados do sorotipo B e verificaram ainda que todas do sorotipo A eram *MAT*  $\alpha$  e as do sorotipo B eram *MAT* A.

## **DROGAS ANTIFÚNGICAS E TESTES DE SENSIBILIDADE**

Antes da descoberta dos antibióticos poliênicos que deu início a uma nova era de sucesso na terapia da criptococose. Várias estratégias terapêuticas foram avaliadas, a maioria sem sucesso. Entre estas, podemos citar o uso de antibióticos como penicilina, tetraciclina e estreptomicina; metais pesados; vacinas autógenas e terapia hormonal. A utilização de estrógenos no tratamento da criptococose foi baseada na observação de que tanto em humanos quanto em animais, os machos eram mais suscetíveis a criptococose quando comparados às fêmeas. Estratégias utilizando métodos físicos como radioterapia e uso de extratos de plantas que apresentavam atividade anticriptocócica foram também experimentadas, sem ou quase nenhum sucesso (CASADEVALL e PERFECT, 1998).

Em 1956, uma mulher diabética de 46 anos, com diagnóstico de meningite criptocócica, foi tratada com um novo antibiótico poliênico, a anfotericina B que apresentava atividade fungicida in vitro. Foi administrada intravenosamente, 100mg da droga ressuspendida em 500 mL de salina contendo 5% de dextrose por 6 horas; durante 12 dias. Seguido de mais cinco semanas de administração em dias alternados. Uma disfunção renal transitória foi observada durante o tratamento, mas no final de sete semanas a paciente estava recuperada e com a cultura do líquido negativa. A introdução da anfotericina B na terapia da criptococose propiciou uma nova perspectiva, aumentando os índices de cura em mais de 50% dos casos (CASADEVALL e PERFECT, 1998).

Anfotericina B tem atividade fungicida de amplo espectro e mesmo apresentando nefrotoxicidade associada em 50% dos pacientes, é o fármaco de escolha nos tratamentos de infecções fúngicas sistêmicas, transpassando a barreira hemato-encefálica (WHITE et al., 1998; BARQUIST et al., 1999). A droga liga-se ao ergosterol presente na membrana plasmática do fungo formando um canal pelo qual saem componentes celulares, principalmente íons potássio provocando desequilíbrio do gradiente iônico, conseqüentemente a morte do fungo (WHITE et al., 1998). ZARAGOZA et al., (2005) examinaram o efeito da droga na morfologia de *C. neoformans*, durante a infecção em murinos observando redução da cápsula polissacarídica e diminuição do antígeno polissacarídico no soro, o que leva a sugestão de um mecanismo de ação adicional para esta droga.

A ocorrência de isolados de *C. neoformans* com resistência primária ou secundária a anfotericina B são relativamente raros e relacionados geralmente com alteração na composição do ergosterol que é o principal esteroide presente na membrana dos fungos (KELLY et al., 1994; JOSEPH-HORNE et al., 1996; RODRIGUES-TUDELA, 1997). Brandt et al., (1996) analisaram isolados seqüenciais de 33 pacientes HIV positivos para verificar se ocorria reinfecção por uma nova cepa ou persistência da mesma com aquisição de resistência. A análise da tipagem demonstrou muito pouca variação nos perfis genotípicos, independente da técnica utilizada e da mesma forma, praticamente não houve variação da CIM. Os autores sugeriram que a persistência da infecção criptocócica foi devida principalmente a falha no regime do tratamento ou do sistema imunológico do paciente e não por reinfecção ou aquisição de resistência à droga. Em Goiânia, 70 isolados clínicos e 40 ambientais foram avaliados quanto à sensibilidade a anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol. Todos os isolados foram sensíveis às quatro drogas, mostrando o mesmo padrão de sensibilidade, independente da origem clínica ou ambiental (SOUZA et al., 2005).

A droga 5-fluorocitosina pertence à classe de fármacos análogos da pirimidina, que interfere na síntese de DNA por inibir timidilato sintetase, e na síntese protéica por se incorporar ao RNA. Resistência primária à droga é comum em certas leveduras e bolores como em espécies de *Candida* não *albicans*, *Aspergillus* spp, *C. neoformans* e em fungos dimórficos. Resistência

secundária também é comum, limitando seu uso clínico a terapias combinadas (WHITE et al., 1998). Bennet et al., (1979) em estudo multicêntrico, compararam os tratamentos, utilizando-se anfotericina B em monoterapia e com esta associada à 5-fluorocitosina. Quando as duas drogas foram utilizadas em associação, 67% dos pacientes apresentaram cura ou melhora do quadro, contra 41% dos pacientes tratados apenas com anfotericina-B. Além disso, nefrotoxicidade menor foi observada, bem como número menor de recaídas no grupo que recebeu 5-fluorocitosina.

O surgimento de derivados azólicos com biodisponibilidade alta e toxicidade baixa, como fluconazol e itraconazol, abriu perspectivas a novos esquemas terapêuticos, sendo usados para fins profiláticos, em esquemas de manutenção da terapia e em uso combinado a anfotericina B. Os azóis são drogas fungistáticas e agem inibindo uma enzima P-450 da via biossintética do ergosterol, a lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase, codificada pelo gene *ERG-11*, interrompendo ou levando a produção insuficiente do ergosterol e conseqüente formação de membranas defeituosas. Espécies de *Mucor* são intrínsecamente resistentes aos azóis, *Candida krusei* e *Aspergillus fumigatus* apresentam resistência primária somente a fluconazol e cetoconazol (WHITE et al., 1998). O uso abusivo dos derivados azólicos tem levado segundo alguns pesquisadores, ao aparecimento de isolados multirresistentes (GRAYBILL et al., 1998). Pfaller et al., (2005a) avaliaram a atividade in vitro do itraconazol em 1615 isolados de *C. neoformans* e a droga foi ativa em apenas 80% dos isolados.

Brouwer et al., (2004) compararam a atividade fungicida da anfotericina B em monoterapia, combinada a 5-fluorocitosina, a fluconazol e ao uso concomitante dos três. O uso combinado de 5-fluorocitosina mostrou melhor eficiência na eliminação do fungo. Larsen et al., (2004) verificaram melhor atividade quando anfotericina B foi administrada em combinação a fluconazol.

Atualmente, novos esquemas terapêuticos foram utilizados no tratamento da criptococose. Preparações de anfotericina B em forma lipossomal têm mostrado boa resposta, com negatificação do líquido mais rápida e com nefrotoxicidade menor (KOTWANI et al., 2001; CHEN et al., 2002, KHAN et al., 2005). Da mesma forma, os novos azóis, posaconazol e voriconazol também mostraram ser mais ativos e com espectro de ação maior

do que fluconazol e itraconazol (PFALLER, 2001; VAN-DUIN, 2004; PFALLER et al., 2004).

Drummond et al., (2007) estudando o comportamento de 11 cepas clínicas de *C. neoformans* provenientes de pacientes com criptococose e 23 ambientais, isoladas de fezes de pombo, frente a fungicidas de uso agrônômico e ao fluconazol observaram que amostras ambientais apresentaram CIM de 64 µg/mL para o fluconazol e as cepas clínicas apresentaram CIM de 16 µg/mL para este antifúngico; e que os antifúngicos usados na lavoura (epoxiconazol, difeconazol e ciproconazol) parecem ter mais eficiência quando comparados aos utilizados na prática médica (fluconazol) porém apresentam maior toxicidade as quais o indivíduo pode se expor involuntariamente.

Concomitantemente ao aparecimento das primeiras drogas antifúngicas, diferentes provas foram utilizadas para determinação da sensibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos e diversas substâncias e o adequado direcionamento terapêutico e, com modificações, estão em uso até hoje. Apesar das condições de realização destas provas serem completamente diferentes das que ocorrem em nossos organismos, quando os resultados são interpretados com sentido comum, são de enorme utilidade para prática clínica. A técnica de diluição em caldo foi a primeira a ser utilizada para avaliar a atividade in vitro dos antimicrobianos e atualmente é a técnica de referência. Consiste em fazer uma série de diluições da droga avaliada em um meio de cultura e após inoculação do microrganismo testado, depois de determinado tempo a adequada temperatura, fornece a concentração do antimicrobiano que produz a inibição completa do microrganismo. Outra técnica de avaliação utilizada foi a de difusão da droga em meio sólido. O princípio da técnica consiste na utilização constante do antimicrobiano num reservatório colocada na placa de meio de cultura para utilizada para cultivar o microrganismo em questão, relacionando a suscetibilidade do microrganismo à droga com o aparecimento de um halo de inibição ao redor do reservatório. Atualmente vários comitês de padronização são bem ativos e suas proposições são aceitas pela Organização Mundial de Saúde. Alguns dos mais ativos são o norte americano “CLSI” (Clinical Laboratory Standards

Institute) e o equivalente europeu “*EUCAST*” (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing).

Os resultados obtidos com estas técnicas padronizadas permitem traçar perfis epidemiológicos sobre a susceptibilidade dos diversos microrganismos, caracterizando-os, possuem aplicações que no tratamento empírico, direto e na política de controle das infecções e são cruciais na descoberta de novas drogas antimicrobianas.

Johnson et. al., (2008) verificaram o perfil de susceptibilidade de 1763 leveduras isoladas de 472 pacientes contra voriconazol, fluconazol, itraconazol e anfotericina B pela técnica de microdiluição (M27-A2 – *CLSI*). Obtiveram correlação entre as CIMs de voriconazol com os de fluconazol e itraconazol, e sugeriram que esta correlação é de grande valia para prever a evolução clínica.

Em 2003, Kustimur et. al. compararam as técnicas de macrodiluição, microdiluição e disco difusão testando 150 isolados de *Candida* sp contra fluconazol. Obtiveram correlação de 86% entre as técnicas de diluição em meio líquido, e 91% entre a Concentração Inibitória Mínima obtida pela macrodiluição e os diâmetros da zona de inibição obtida pela técnica de disco difusão. Silici e Koc (2006) fizeram um estudo comparativo das metodologias de disco difusão e macro e microdiluição em ágar conforme documento do *CLSI*, para verificar a atividade antifúngica de própolis e itraconazol contra leveduras isoladas de pacientes com micoses superficiais. Entre metodologias de diluição houve 75% de concordância testando as leveduras contra própolis. Obtiveram uma correlação favorável entre CIM e o diâmetro da zona de inibição ambos para própolis sugerindo que a diluição em ágar e a disco difusão são alternativas convenientes para testar a sensibilidade destas leveduras frente ao própolis. Canton et. al., (2008) avaliaram a suscetibilidade de 224 isolados de diferentes espécies de leveduras contra a droga antifúngica posaconazol pelas técnicas de disco difusão e microdiluição de acordo com os documentos M44-A e M27-A2 do *CLSI* e não detectaram discrepâncias significativas entre os resultados obtidos pelas duas técnicas sugerindo que a metodologia de disco difusão poderia ser uma alternativa ao método de microdiluição de referência.

## **SANEANTES**

Os saneantes são produtos controlados pela Vigilância Sanitária e utilizados com os mais diferentes objetivos. Podem ser utilizados como desengordurantes (detergentes domésticos), microbicidas (esterilizantes e desinfetantes hospitalares e desinfetantes domésticos) e são utilizados ainda para combater pragas, como os inseticidas, os repelentes e os raticidas. São divididos em duas categorias, dependendo do risco que o produto pode impor à saúde humana. Os de maior potencial de risco são considerados de GRAU DE RISCO II e compreendem os saneantes domissanitários e afins que sejam cáusticos, corrosivos, os produtos com valor de pH, em solução a 1%, igual ou menor a 2 e igual ou maior a 12, com atividade antimicrobiana, os desinfestantes, os produtos biológicos à base de microorganismos e produtos com alto poder oxidante ou redutor, como por exemplo inseticidas, raticidas, repelentes, esterilizantes hospitalares e desinfetantes domésticos, que necessitam registro junto ao Ministério da Saúde. Já os de menor potencial, GRAU DE RISCO I compreendem os saneantes domissanitários e afins em geral, excetuando-se os classificados como de Risco II, como por exemplo, detergentes domésticos e amaciantes de roupa, dispensados do registro no M.S. (Resolução nº 336, de 22/07/1999, Portaria nº 327, de 30 de junho de 1997, Portaria nº 57, de 11 de julho de 1995).

Produtos disponíveis para utilização como saneante, seja para uso ambiental ou doméstico, nos dias de hoje, possuem diversas implicações como cheiro, dificuldade de manuseio, toxicidade, custo, potencial de persistência e acúmulo no meio ambiente, dentre outras que podem ter efeito lesivo contra saúde humana. Muitos trabalhadores rurais empregam antifúngicos de uso agrônômico e estes, apesar de serem aparentemente mais eficientes também apresentam alta toxicidade as quais podem levar a uma intoxicação involuntária, além de selecionar leveduras ambientais resistentes pela similaridade de ação com algumas das drogas disponíveis para uso clínico. Baseados nisso, investigamos a possibilidade de utilização de extratos de plantas como saneante.

O estudo para obtenção de saneantes provenientes de fontes naturais com atividades antifúngicas específicas para ser utilizados como saneantes

ambientais ou domésticos contra alvos específicos são de grande importância e valia no combate e controle das fontes de microrganismos patogênicos em seu nicho e ajuda para diminuição da contaminação humana, seja de trabalhadores ou especialmente de indivíduos imunocomprometidos.

## **ESTUDO DE EXTRATOS DE PLANTAS NATIVAS**

A exploração inadequada dos recursos naturais vem provocando a extinção de um grande número de espécies nos diferentes biomas do planeta, especialmente naqueles situados nos trópicos. Entre as várias causas dessas extinções, as mais comuns são a perda e a fragmentação de “habitats”. Nas últimas décadas, tem sido observado crescimento de interesses em medicinas alternativas e terapias naturais, em especial, aquelas que envolvam substâncias com propriedades antimicrobianas (FERNANDES, et al, 2007).

Extratos de plantas, ou componentes derivados de plantas, promovem uma valiosa fonte de novos agentes medicinais (CARVALHO e FERREIRA, 2001; KAYSER e KIDERLEN, 2001). As plantas são usadas na medicina desde longa data, sendo extensivamente empregadas na medicina popular por representarem uma alternativa econômica, de fácil obtenção e aplicabilidade para diversas patologias (ROJAS et al., 2006). Estas se constituem, portanto em uma ótima alternativa para busca de substâncias que podem ser usadas na formulação de novos antifúngicos (HOLETZ et al., 2002). A ampla biodiversidade presente no território brasileiro nos coloca em posição estratégica para o desenvolvimento da exploração racional e sustentável de novos metabólitos de valor terapêutico. A grande extensão territorial do país, com ampla diversidade de climas e solos, favorece essa biodiversidade. Determinadas áreas como a floresta Amazônica, Atlântica, o Cerrado brasileiro e a Caatinga são ricos em espécies que podem fornecer compostos naturais ativos, para grande variedade de doenças crônicas degenerativas, malária, tuberculose, micoses e muitas outras (BASSO et al., 2005).

A Flora do Estado de São Paulo é composta pelos biomas do Cerrado e Mata Atlântica. O Cerrado, com sua vegetação típica de troncos tortuosos, de porte baixo, ramos retorcidos, cascas espessas e folhas grossas, restando

50% do território original, é reconhecido como a savana mais rica do mundo em biodiversidade, com uma flora riquíssima composta por mais de 10.000 espécies de plantas, sendo 4.400 endêmicas desta área. Já a Mata Atlântica, com apenas 7,3% de sua cobertura florestal original e tendo sido identificada como a quinta área mais ameaçada e rica em espécies endêmicas do mundo, possui cerca de 20.000 espécies de plantas vasculares, dos quais 8.000 são endêmicas do bioma (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, 2006).

Alguns extratos de plantas medicinais com atividade antifúngica foram pesquisados por nosso grupo e de acordo com esta experiência testes padronizados são necessários para que se tenham dados fidedignos e comparativos entre os diferentes estudos (SCORZONI et al, 2007). Em pesquisa realizada por Braga et al 2007 utilizando as plantas *Bixa orellanastram*, *Ocimum gratissimum* e *Syzygium cumini*, foram encontradas atividade contra *Cryptococcus neoformans* apresentando concentração inibitória mínima com valor de 0,078 mg/mL. Outro estudo focado na verificação da atividade antifúngica de plantas foi realizado por Cruz et al, 2007, mostrando que as espécies *Ziziphus joazeiro* e *Caesalpineia pyramidalis* apresentaram atividade significativa contra *Cryptococcus neoformans*. O óleo essencial obtido a partir das sementes dos frutos de *Caryocar brasiliensis* planta amplamente distribuída nas regiões central e sudeste do Brasil, tem atividade antifúngica contra esta levedura (PASSOS et al., 2002). O interesse por plantas ou substâncias antifúngicas se deve ao aumento de infecções fúngicas humanas, como resultado das imunodeficiências associadas a *AIDS*, quimioterapia anticancerígena, transplantes e, também infecções fúngicas em plantas que representam perdas incalculáveis para a agricultura.

Assim, o Projeto Temático – BIOTA/FAPESP (Bioprospecta), intitulado “*Conservation and sustainable use of the plant biodiversity from Cerrado and Atlantic Forest: chemical diversity and prospecting for potencial drugs*“, desenvolvido pelo Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) do Instituto de Química - UNESP em associação com o laboratório de Micologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, visa o estudo de espécies vegetais do Cerrado e Mata Atlântica do Estado de São Paulo, baseado em bioensaios prévios dos extratos, com

vistas ao estabelecimento de modelo para a preservação, estudo e exploração racional da flora remanescente no Estado.

A família *Rubiaceae* Juss., pertencem a ordem *Gentianales* e compreendendo cerca de 600 gêneros e 10.000 espécies, tem distribuição predominantemente tropical e subtropical e é constituída essencialmente de espécies lenhosas, entretanto, observa-se a ocorrência de alguns representantes herbáceos e arbustivos (ROBBRECHT, 1988\* apud BOLZANI et al., 2001; TREVISAN, 1993). Considerada a quarta maior família de angiospermas do Brasil, com 1.010 espécies (10% das espécies em relação ao total mundial) (SHEPHERD, 2003), está amplamente distribuída nos biomas mais representativos: Amazônia, Mata Atlântica e Cerrado. Neste último, são encontrados 25 gêneros, sendo o maior número de espécies encontrados nos gêneros *Alibertia*, *Psycotria*, *Palicourea* e *Tocoyena* (CASTRO, 1999).

A família se destaca por apresentar espécies de considerável expressão econômica, como o café (*Coffea arabica*) e, também, espécies de interesse farmacológico, como *Cinchona ledgeriana*, de onde é extraído o antimalárico quinina e *Cephaelis ipecuanha*, onde se extrai ipeca, utilizada como expectorante na medicina popular (TREVISAN, 1993).

Os poucos relatos encontrados na literatura sobre o gênero *Alibertia*, pertencente à subfamília *Ixoroideae*, faz destaque a sua rica constituição terpenoídica. Estudos anteriores realizados com as espécies *Alibertia sessilis* e *A. macrophylla* levaram ao isolamento de alguns metabólitos secundários com atividade antifúngica: ésteres do ácido cafeico e iridóides não-glicosilados (BOLZANI et al., 1991; YOUNG et al., 1992; SILVA et. al., 2007).

Os extratos de plantas *Alibertia macrophylla* Schum. pertencem a família *Rubiaceae* e *Machaerium villosum* Vog. pertencente à família *Leguminosae*, conhecido vulgarmente por Jacarandá paulista, ambas espécies de ampla distribuição (BOTREL e CARVALHO, 2004) e nativas do cerrado paulista, foram previamente testadas para verificação de atividade antifúngica em nosso laboratório. Estas plantas são encontradas do sul do México até o norte da Argentina, e ainda como flora do cerrado Paulista, mas também nos estados do Ceará, Goiás, Mato Grosso e Minas. Seus extratos hexânicos e etanólicos são extraídos diretamente da torta dos caules, secos e

moídos. Já a família *Leguminosae* compreende 642 gêneros e 18 mil espécies distribuídas pelos cinco continentes, com ocorrência predominante em países tropicais e subtropicais (DISTASI e HIRUMA, 2002). O gênero *Machaerium* compreende cerca de 130 espécies, também podendo ser encontradas do México até Argentina. O extrato etanólico das folhas de *M. villosum* possui forte atividade antioxidante.

#### **JUSTIFICATIVA:**

Em se tratando de fungos, os saneantes ou desinfetantes atualmente disponíveis para utilização apresentam toxicidade relativa ao homem e meio ambiente. Neste sentido, uma possibilidade mais segura para ambos, homem e meio ambiente, pode ser a utilização de extratos de plantas que possuam atividade antimicrobiana específica para este fim. O estudo destas atividades específicas que as plantas nativas do bioma Brasileiro, em especial da Mata Atlântica apresentam, se revela como uma alternativa biotecnológica possivelmente segura e economicamente viável. Portanto, a pesquisa de produtos naturais a partir de plantas com atividade antifúngica para fins saneantes, pode ser de grande valia para diminuição ou até interrupção da cadeia do processo infeccioso pelo referido fungo, *C. neoformans*, diminuindo/inviabilizando/eliminando-o quantitativamente em seu *habitat* natural com menor nível de agressão ao meio ambiente e outros ecossistemas, especialmente se não apresentar alto grau de toxicidade ao ser humano.

## OBJETIVOS :

### A) Geral:

Selecionar e estudar a dinâmica populacional de *C. neoformans* provenientes de fontes ambientais da região de Araraquara;

### B) Específicos:

1. Comparar o padrão fenotípico com o genotípico de *C. neoformans* de fontes ambientais;

2. Determinar o padrão de resposta aos antifúngicos anfotericina B, cetoconazol, itraconazol e fluconazol por duas metodologias: disco-difusão e microdiluição;

3. Realizar a determinação para atividade antifúngica específica de extrato hexânico de *Alibertia macrophylla* e extrato etanólico de *Machaerium villosum*, determinando concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM).

4. Testar a utilização de extrato hexânico de *Alibertia macrophylla* e extrato etanólico de *Machaerium villosum* com finalidade saneante específica em ambiente simulado, mimetizando condições reais.

5. Fornecer dados que orientem novos estudos biotecnológicos que tenham como objetivo viabilizar a produção de saneantes utilizando extratos de plantas nativas de nosso bioma.

## **METODOLOGIA**

### **SELEÇÃO DOS ISOLADOS**

As 67 amostras ambientais de *C. neoformans* foram isolados por Andrade et al. (2003) para realização da dissertação de mestrado intitulada “*Cryptococcus neoformans* Aspectos fenotípicos e genotípicos de isolados ambientais da região de Araraquara, SP” e estocados na micoteca do Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual Paulista de Araraquara, São Paulo. Estes isolados foram reidentificados e mantidos em ágar Sabouraud com cloranfenicol a 4°C, até o momento dos testes.

### **IDENTIFICAÇÃO DE *C. neoformans***

#### **Exame microscópico dos isolados**

As colônias isoladas foram observadas em preparações microscópicas com tinta da China para observação de cápsula polissacarídica.

#### **Identificação:**

Os isolados foram reidentificados em gênero através de critérios, segundo Kurtzman e Fell (1998) e Kwon-Chung et al. (1992), como se segue:

1. Prova de urease: uma alçada microbiológica do cultivo da levedura de 48 a 72 horas de crescimento foi semeada em ágar uréia de Christensen e incubada a 37°C para observar produção de urease, evidenciada pela mudança de cor do meio para rosa.
2. Presença de enzima fenoloxidase: realizada em ágar niger a partir da cultura obtida em ágar Sabouraud, com 24 a 48 horas de crescimento. As culturas foram incubadas a 25°C e observadas diariamente até o 10<sup>o</sup> para verificar a produção de pigmentos de coloração marrom.

3. Índice de gemulação – IG – (número de células em brotamento/100 células de levedura).
4. Assimilação de fontes de carbono: realizada a partir de cultivos prévios em placas de ágar Sabouraud de 24 a 48 horas de crescimento.

A determinação das espécies foi executada com base em provas de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio (KURTZMAN e FELL et al., 1998), a partir de cultivos prévios em placas de ágar Sabouraud de 24 a 48 horas de crescimento. Os açúcares glicose, galactose, lactose, melibiose, sacarose, maltose, rafinose, celobiose e inositol foram utilizados como fontes de carbono e nitrato de potássio como fonte de nitrogênio.

Os inóculos foram preparados a partir de suspensões de  $10^8$  células/mL (aferidos em câmara de Neubauer), os quais foram adicionados aos meios (C e N, fundidos previamente e separadamente) na proporção de 1/20. Após a solidificação, as fontes de carbono e nitrogênio foram distribuídas equidistantemente nas placas contendo os meios C e N, respectivamente, incubada a 25°C e lidas após 48 a 72 horas.

A diferenciação das espécies *gattii* e *neoformans* foi realizada pelo crescimento seletivo em meio glicina-canavanina-azul de bromotimol (CGB) e por assimilação de D-prolina, segundo Kwon-Chung et al. (1982). Leveduras com 24 a 48 horas de crescimento em ágar Sabouraud foram semeadas em tubos contendo ágar CGB e incubadas a 25°C. O cultivo foi observado diariamente até o quinto dia para a verificação de crescimento e alteração da cor.

A assimilação de D-prolina foi realizada através da prova de assimilação de fontes de nitrogênio em meio N (KWON-CHUNG et al., 1982).

### **REAÇÃO DE PCR UTILIZANDO OS INICIADORES PARA DETERMINAÇÃO DO MATING TYPE $\alpha$ E A**

Foram utilizadas as seqüências iniciadoras para *mating type  $\alpha$* : 5'CTTCACTGCCATCTTCACCA3' e 5'GACACAAAGGGTCATGCCA3', e para *mating type a*, a seqüência 5'CGCCTTCACTGCTACCTTCT3' e 5'AACGCAAGAGTAAGTCGGGC3' (CHATURVEDI et al., 2000). Foram utilizadas concentrações de 25pmol de cada seqüência iniciadora e 25ng de

DNA genômico num tubo contendo uma mistura de deoxinucleotídeos (0,22mM de cada dNTP), tampão (1,65mM MgCl<sub>2</sub>, 55mM KCl, Tris-HCl 22mM pH 8,4) e DNA polimerase termoestável fornecidos pelo Kit PCR Supermix (*Invitrogen-life technologies*). A quantidade final na reação de amplificação foi de 25µL sendo utilizada água *Milli-Q* estéril.

A amplificação foi realizada através de um ciclo inicial com temperatura de desnaturação de 95°C/3 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C/1 minuto, 57,5°C/1 minuto, 72°C/1 minuto e um ciclo final a 72°C/7 minutos, utilizando-se aparelho termociclador Perkin Elmer modelo *GeneAmp PCR System 9700*. O produto amplificado foi separado em gel de agarose 2%, em tampão TBE 1x, durante 2 horas a 100 volts, corado com brometo de etídio e observado à luz ultravioleta.

### **REAÇÃO DE PCR-RFLP PARA AMPLIFICAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DO GENE DA OROTIDINA MONOFOSFATO PIROFOSFORILASE (URA 5)**

Foram utilizados os iniciadores para o gene URA5: *ura5f* (5' ATGCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG 3') e *ura5r* (5' TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC 3') (MEYER et al., 2003).

Foram utilizadas concentrações de 50 pmol de cada seqüência iniciadora e 25ng de DNA genômico num tubo contendo uma mistura de deoxinucleotídeos (0.22mM de cada dNTP), tampão (1,65mM MgCl<sub>2</sub>, 55mM KCl, Tris-HCl 22mM pH 8,4) e DNA polimerase termoestável fornecidos pelo Kit PCR Supermix (*Invitrogen-life technologies*). A quantidade final na reação de amplificação foi de 50µL sendo utilizada água *Milli-Q* estéril.

A amplificação foi realizada através de um ciclo inicial com temperatura de desnaturação de 94°C/3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C/45 segundos, 61°C/1minuto, 72°C/2 minutos e um ciclo final a 72°C/7 minutos, utilizando-se aparelho termociclador Perkin Elmer modelo *GeneAmp PCR System 9700*.

O produto amplificado foi digerido com as enzimas de restrição *Sau96I* e *HhaI* por 3 horas ou *overnight* e os produtos, separados por eletroforese em gel de agarose a 3% em tampão TBE 1x durante 5 horas e 30 minutos a 100 volts, corados com brometo de etídio e observados à luz ultravioleta.

## **CEPAS DE REFERÊNCIA**

Foram utilizadas neste trabalho, as seguintes cepas de referência: WM148 (VNI - sorotipo A), WM626 (VNII - sorotipo A), WM628 (VNIII - sorotipo AD), WM629 (VNIV - sorotipo D), WM179 (VGI - sorotipo B), WM178 (VGII - sorotipo B), WM161 (VGIII - sorotipo B), WM779 (VGIV - sorotipo C) (MEYER et al., 2003) e ATCC 28957 (sorotipo D, MAT $\alpha$ ) e ATCC 28958 (sorotipo D, MAT $\alpha$ ); *Cryptococcus neoformans* (ATCC 90012) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019).

## **PADRONIZAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DO INÓCULO**

Mcfarland é o nome da escala utilizada para confecção de suspensões bacterianas utilizadas no laboratório clínico para diversos tipos de testes em especial, os de sensibilidade aos antimicrobianos. Usualmente a descrição das técnicas padronizadas na literatura utiliza inóculos “comparativos” à escala de Mcfarland, que fornece uma quantidade de turbidez fornecida pelo sulfato de bário, formada pela reação entre uma solução de cloreto de Bário a 1% e outra de ácido sulfúrico a 1%, padronizada para confecção do inóculo com bactéria associando sua escala 1 a aproximadamente 300 milhões de microrganismos, leia-se bactérias. Como a célula de uma levedura tem várias vezes o tamanho de uma célula bacteriana, haverá uma distorção para menos no número de leveduras necessárias para atingir um índice de turbidez na escala de Mcfarland, que representaria uma quantidade maior de células bacterianas. Para eliminarmos esta distorção, padronizamos o inóculo correlacionando o número de leveduras obtido na contagem de uma suspensão de leveduras em salina 0,85% em câmara de Neubauer com a densidade ótica obtida pela leitura da absorbância verificada a 530nm, de três volumes de inóculo, através de diluições seriadas, em triplicata.

## **TESTES DE SENSIBILIDADE**

Os perfis de sensibilidade dos isolados foram estudados frente à anfotericina B, cetoconazol, fluconazol e itraconazol, segundo o documento M44-A (2004) do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). Foi utilizado o meio de *Mueller-Hinton* acrescido de 2% de glicose e 0,5µg/mL de azul de metileno. Após preparo, o meio foi distribuído em placas de Petri de modo a formar uma camada de aproximadamente 4 mm. As placas foram incubadas por 48h para testar a esterilidade. Um inóculo de 10<sup>6</sup> células/mL de solução fisiológica (0,85% NaCl) (aferidos em câmara de Neubauer) foi aplicado com *swab*. Após 15 minutos foram aplicados os discos contendo os antifúngicos na superfície do meio, e aguardado 30 minutos para pré-difusão dos antifúngicos anteriormente citados. Em seguida, as mesmas foram invertidas e incubadas em BOD a 35°C para leituras em 24h e 48h. Os discos antifúngicos foram obtidos diretamente com o fabricante e armazenados conforme instruções do fabricante (CECON®) até utilização.

Foram também estudados os perfis de sensibilidade frente ao fluconazol e aos extratos hexânico de *Alibertia macrophylla* e etanólico de *Machaerium villosum* de acordo com o documento M27-A2 (2002) do CLSI com modificações (Rodriguez-Tudella, 2002). Foi utilizado o meio RPMI 1640 (com L-glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol), tamponado com MOPS [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico] pH 7,0 acrescido de 2% de glicose e incubação a 35°C, sob agitação constante, durante 48 horas, utilizando placas estéreis com 96 poços de fundo plano. A leitura para determinação da CIM (concentração inibitória mínima) foi realizada através de espectrofotometria em 490nm. A determinação dos valores da CIM foi feita pela inibição de 50% (IC50) do crescimento, quando comparada ao controle positivo (meio livre de droga + suspensão de levedura) para fluconazol e 100% de inibição para os extratos. Foi utilizada como controle dos testes uma cepa padrão ATCC 90012 de *C. neoformans*, gentilmente cedida pelo Dr. Juan Luis Rodriguez Tudela, da Unidade de Micologia – Centro Nacional de Microbiologia – Instituto de Salud Carlos III – Madrid – Espanha.

As drogas antifúngicas foram obtidas diretamente dos fabricantes na forma de pó e calculadas, quanto às suas potências seguindo recomendações do documento (M27-A2, CLSI 2002). A solução-estoque de fluconazol foi

preparada em água destilada estéril e ajustada para 10240µg/mL. A partir destas concentrações foram preparadas 10 soluções intermediárias seguindo o esquema de diluição do documento. As concentrações intermediárias variaram de 1280 a 2,5µg/mL para fluconazol.

O meio líquido utilizado para a diluição das drogas e para ajuste do inóculo foi o RPMI 1640 (com L-glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol) na concentração de 10,4g/L acrescido de 2% de glicose e tampão MOPS 0,165M, pH 7,0, esterilizado através de filtração e conservado em refrigerador a 4°C.

As soluções intermediárias da droga foram diluídas 1:10 para fluconazol para se obter uma solução de trabalho de 64 a 0,125µg/mL que foi dispensada (volume de 100µL) nos poços da coluna 2 a 11. A fileira 2 contendo a maior e a 11 a menor concentração da droga, respectivamente.

A solução intermediária dos extratos foi obtida pela diluição da massa em DMSO (dimetilsulfóxido) de modo a se obter diluições de 250 a 0,48µg/mL do extrato de *Alibertia macrophylla* e de *Machaerium villosum*.

Foram utilizadas culturas recentes com 48 horas de crescimento em meio de ágar Sabouraud a 30°C. Colônias isoladas foram suspensas em 5mL de solução salina estéril 0,85% e homogeneizadas em aparelho Vortex® por 15 segundos. A concentração dos inóculos foi ajustada até se obter uma transmitância equivalente a escala 0,5 de McFarland, correspondente a uma concentração na ordem de  $1,0 - 5,0 \times 10^6$  UFC/mL, e confirmadas em câmara de Neubauer. Posteriormente, os inóculos foram diluídos 1:100 em meio RPMI 1640, para obtenção de  $1,0 \times 10^4$  UFC/mL. Esta última foi dispensada nos poços de 02 a 12 (volume de 100µL) começando da fileira 2 que continha 100µL da maior concentração de droga até a 11 com a menor concentração. Este passo diluiu o inóculo ( $0,5 \times 10^4$  UFC/mL) e a concentração das drogas à metade (64 a 0,125 µg/mL para fluconazol). O controle de crescimento consistiu de 100µL de meio livre de droga (C+), e 100µL da suspensão de levedura (poço 12). O poço da fileira 01 não continha suspensão de levedura, apenas meio livre de droga (200µL), funcionando como controle de esterilidade ou branco para leitura espectrofotométrica (C-).

As placas foram incubadas a 35°C, sob agitação constante, e a leitura foi realizada após 48 a 72 horas, visualmente, também através de leitor

automatizado para placas de microdiluição a 490nm e, com auxílio de um corante supravital, ALAMAR BLUE, de acordo com o documento M27-A do CLSI (1997).

O CLSI estabelece como critério para os limites de corte utilizando o antifúngico fluconazol em cepas de *Candida albicans*, valores de IC50  $\leq$  8,0 $\mu$ g/mL foram consideradas sensíveis, entre 16-32 $\mu$ g/mL sensíveis dependente de dose e  $\geq$  64 $\mu$ g/mL resistentes. De acordo com estudo de Aller et al, 2000, estudando a resposta de cepas clínicas frente ao fluconazol, o valor de CIM de 16  $\mu$ g/mL deveria ser considerado como limite de corte entre resistência e sensibilidade, pois em pacientes com isolados acima deste valor, foi observada falha terapêutica.

### **ANÁLISE DE ATIVIDADE SANEANTE DE EXTRATOS VEGETAIS.**

Para a simulação do ambiente a ser descontaminado, 20,0 g de fezes de pombos (*Columba livia*) previamente testadas para presença de *C. neoformans*, foram diluídas em 20mL de solução fisiológica (0,85% NaCl) (1g/mL). Estas foram divididas em duas placas de Petri (90mm x 13mm) estéreis, com 10mL cada. Uma alíquota de 100 $\mu$ L foi semeada em meio de níger e meio RPMI acrescido de 2% glicose e incubados a 35°C por 48 horas. Essa suspensão de excremento foi espalhada em placa de Petri e irradiada com luz ultravioleta (UV) em câmara de fluxo laminar por uma hora e trinta minutos. Após irradiação, foi semeado em meio de níger e RPMI acrescido de 2% glicose, 100 $\mu$ L de cada placa, incubadas a 35°C por 48h. Após 48 horas, 100 $\mu$ L de cada tubo de RPMI (anteriormente incubadas) foi semeado em meio de níger para confirmação da eficácia da esterilização pela incidência da luz UV.

Posteriormente foi adicionada às amostras irradiadas, suspensão de levedura na concentração de 10<sup>5</sup> UFC/mL (aferidos em câmara de Neubauer). Para tanto realizamos uma diluição da suspensão inicial de 1:10 em salina 0,85% (10<sup>7</sup> UFC/mL) e foram separadas alíquotas das amostras (suspensão de fezes acrescida do extrato) para adição do inóculo ajustando este para valor final de 10<sup>5</sup> UFC/mL, baseado em Klepser et al. (1998), Rodero et al. (2000), Ernst et al. (2002) e Lewis et al. (2002) com adaptações, para realização da

cinética de morte (leia-se curva de sobrevivência) apresentada no fluxograma a seguir. Ensaio também foram realizados com fluconazol e com hipoclorito. Uma alíquota sem adição de extratos, drogas ou hipoclorito foi preparada para controle positivo de crescimento (sobrevivência). Todas as alíquotas foram semeadas em duplicata e os inóculos foram feitos com 14 cepas ambientais (CIM 16µg/mL para fluconazol), uma cepa de referência de *C. neoformans* (ATCC 90012) e uma de *C. parapsilosis* (ATCC 22019).

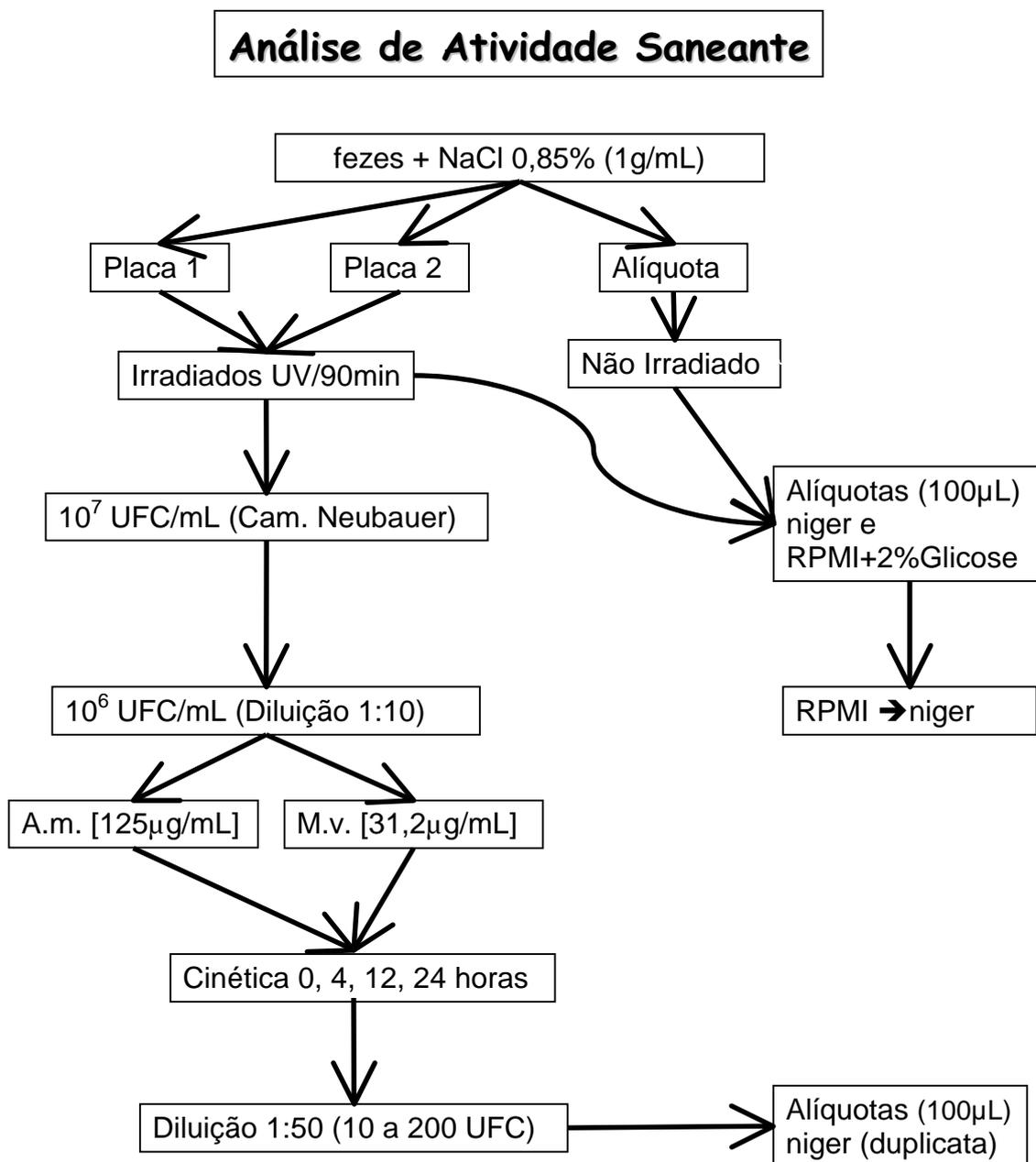
Os extratos hexânico de *A. macrophylla* e etanólico de *M. villosum* foram adicionados à suspensão na concentração de 500µg/mL e 125µg/mL respectivamente, previamente determinadas pelo método da microdiluição, conforme documento do CLSI (M27- A2 de 2002). O antifúngico fluconazol foi adicionado à suspensão na concentração de 32µg/mL, e o hipoclorito de sódio a 2%. O limite de detecção deste teste foi de 8 UFC/mL, calculado segundo Pearson et. al. (1980). O *endpoint* foi considerado quando obtivemos 99,9% de redução no número de UFC/mL do inóculo inicial, sem adição do extrato, e determinado para cada isolado.

Foi realizada cinética por tempo de incubação e alíquotas de 100µL foram plaqueadas em duplicata em meio de niger a partir do tubo tratado nos tempos de 0, 4, 12, 24 horas de contato com os extratos, fluconazol e hipoclorito bem como com ausência de adição (controle de sobrevivência). Para se obter uma contagem adequada do número de colônias nas placas (de 10 a 200 UFC), uma diluição da suspensão já com o extrato e o inóculo, de 1:50 foi realizada.

Após 48 à 72h de incubação a 35°C foram avaliados o número de UFC e o resultados foram representados por gráficos (figuras 7 a 13). Na ordenada está representado o número de UFC/mL e na abscissa o tempo, em horas, em escala aritmética.

Por adotarmos modificações na técnica de curva de morte descrita por Klepser et al. (1998), Rodero et al. (2000), Ernst et al. (2002), Lewis et al. (2002) e por Tudela (2002) para mimetizarmos as condições encontradas no meio ambiente, fizemos uma avaliação “piloto” para padronizar qual o inóculo mais adequado a ser utilizado neste experimento.

**FLUXOGRAMA:**



## ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Para entendermos de forma mais adequada os resultados obtidos pelas provas de sensibilidade e pela cinética de morte foi realizada análise estatística, com índice de confiabilidade de 0,01 ( $p \leq 0,01$  – hipótese de nulidade); através do software SPSS® VERSÃO 11.5, recomendado e utilizado pela O.M.S. em suas diversas análises.

Para análise estatística das diferentes condições foram utilizados testes paramétricos ou não-paramétricos diversos, no software SPSS® VERSÃO 11.5, a saber: (1) na comparação do desempenho entre diferentes grupos, com diferentes participantes, foi utilizado o Teste *Mann-Whitney U* e (2) para comparar o desempenho dos mesmos participantes, em diferentes condições, foi utilizado o Teste *Wilcoxon*. Todas as estatísticas foram implementadas com grau de exigências em *two-tailed*.

Para confecção dos gráficos, médias, moda, mediana e desvio padrão utilizamos o Microsoft Excel 2007®, que permite interação e exportação de dados para o SPSS para detalhamento da análise. Todos os dados categóricos foram calculados na forma de frequência absoluta (n) e relativa (%), e comparada pelo teste de Pearson ou Exato de Fisher, de acordo com o tamanho da amostra ou ainda, *kruskal Wallis*, confrontando diversas variáveis simultaneamente. Para avaliar variáveis contínuas e semicontínuas entre as variáveis, foi utilizado o teste de Spearman e ao índice de correlação foi atribuído valores entre 0 e 1, considerando o valor 1 como uma correlação ideal e valores acima de 0,4 como uma boa correlação. Os valores de CIM bem como os halos de inibição foram analisados em intervalo, média, mediana e moda. Os dados contínuos e semicontínuos foram analisados em mediana e comparados através do teste de *Mann-Whitney*.

## **EFICIÊNCIA DE DESINFECÇÃO:**

Avaliamos também a eficiência do método de desinfecção, em porcentagem, através do cálculo da taxa de morte da levedura frente ao extrato de *A. macrophylla* (500µg/mL), fluconazol (32µg/mL) e hipoclorito (2%) através do seguinte cálculo:

$$E (\%) = \frac{n_0 - n_f}{n_0} \times 100 \quad \text{onde:}$$

E = eficiência, em porcentagem;

$n_0$  = Concentração inicial de fungos;

$n_f$  = Concentração final de fungos após os métodos de desinfecção.

## **ESTABILIDADE DO EXTRATO:**

Para avaliarmos a estabilidade dos extratos utilizados, submetemos estes a diferentes condições físicas, a saber: incidência direta de luz solar por 90 minutos (horário: 11h30min as 13h00min – 32°C ao sol), aumentamos a temperatura de exposição (60°C) bem como variamos o pH (4 e 8), e também testamos o tampão utilizado no teste com pH Alcalino (Tris).

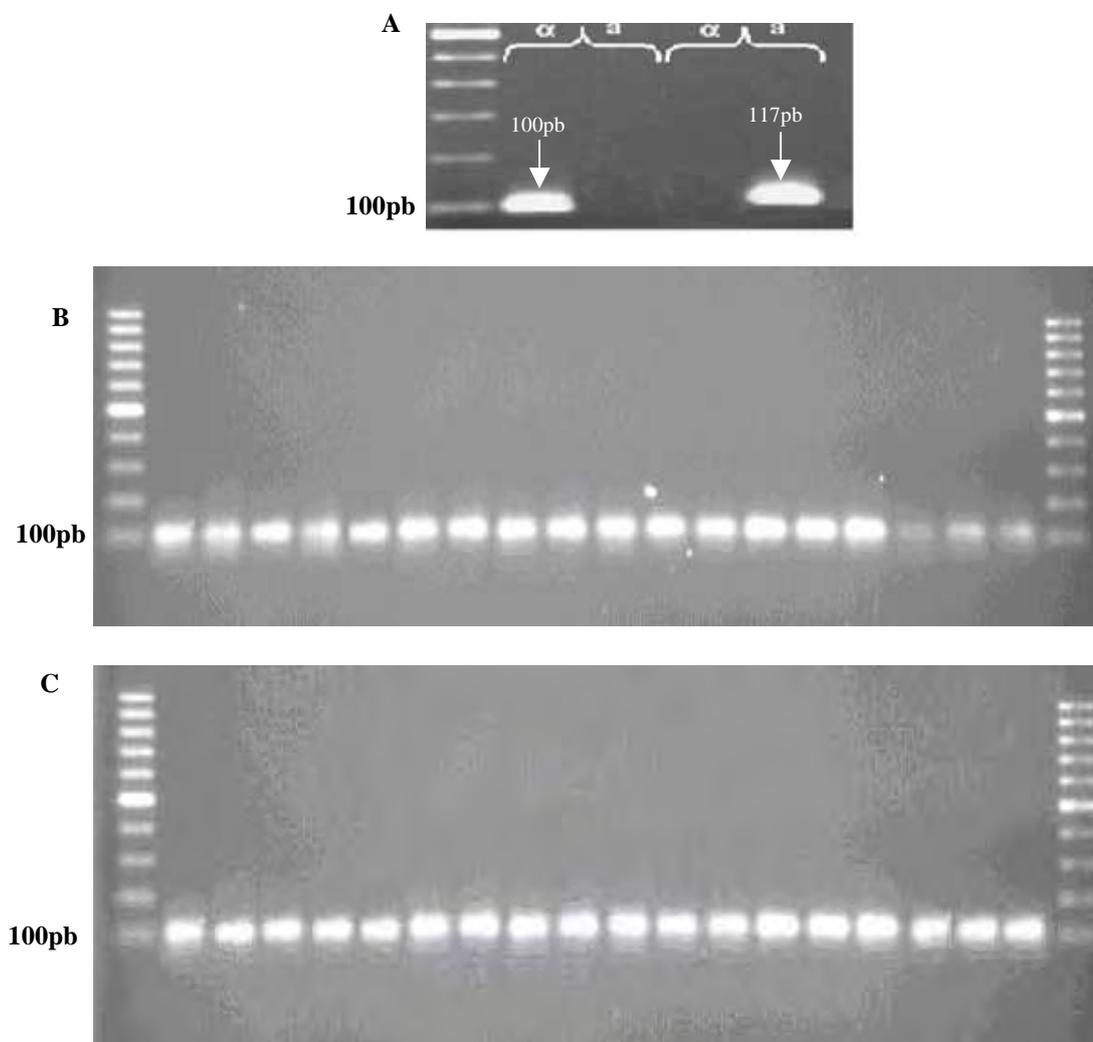
Para tanto submetemos a cepa ATCC 90012 de *C. neoformans* aos extratos que foram expostos às condições anteriormente citadas, e aos mesmos testes de susceptibilidade aos antifúngicos Fluconazol e Anfotericina B e comparamos os resultados aos obtidos nos testes realizados sem tais variações.

## RESULTADOS:

Neste estudo os 67 isolados de fontes ambientais da cidade de Araraquara foram reidentificados pelas técnicas clássicas de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, exame com tinta da china, produção de fenoloxidase e urease, crescimento em CGB, e assimilação de inositol e D-prolina. Todos isolados foram reclassificados como *C. neoformans*. Estes apresentaram cápsula ao exame com tinta da China, produziram urease e assimilaram inositol. Todos os isolados foram negativos para KNO<sub>3</sub> na prova de assimilação de fontes de nitrogênio e positivos para glicose, galactose, sacarose, maltose, inositol, negativos para melibiose e lactose e variáveis para rafinose e celobiose. Nenhum dos isolados foi identificado como pertencente à espécie *gattii* apresentando crescimento negativo em meio de CGB e ausência de assimilação de D-prolina.

## DETERMINAÇÃO DOS *MATING TYPE* POR PCR

Os iniciadores específicos, para determinação dos tipos *MAT* $\alpha$  e *MAT**a* dos 67 isolados de *C. neoformans*, foram utilizados para amplificar fragmentos específicos de 101pb e 117pb, respectivamente. As cepas ATCC 28957 (sorotipo D, *MAT* $\alpha$ ) e ATCC 28958 (sorotipo D, *MAT**a*) foram usadas como controles positivos. A análise dos mating type mostrou prevalência de 100% de *MAT* $\alpha$  (Figura 1).



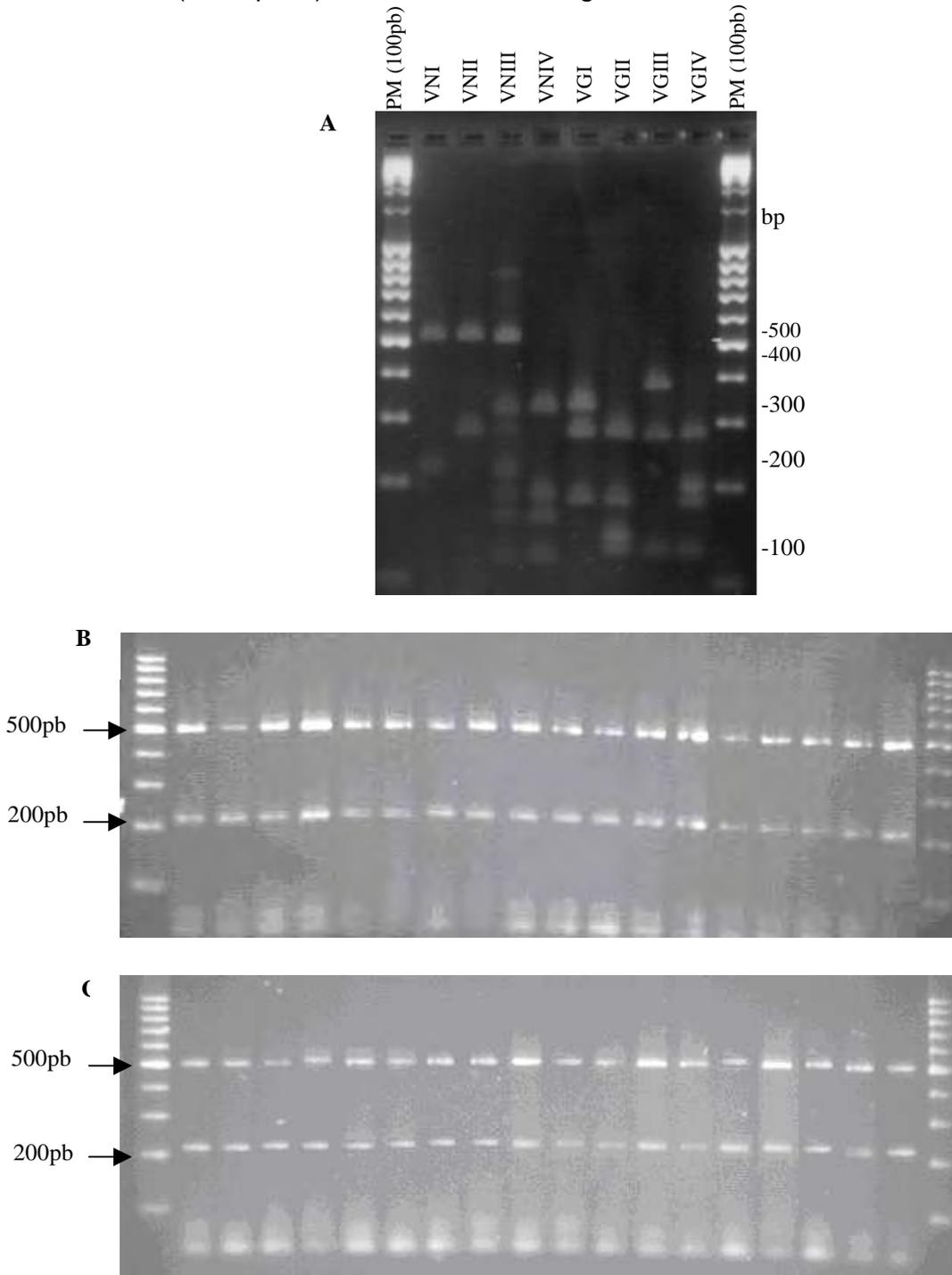
**Figura 1.** Gel representativo dos produtos de PCR de isolados de *C. neoformans* obtidos com os iniciadores para *mating-type*  $\alpha$  e *a*.

**A** – 1, ATCC 28957 (*MAT* $\alpha$ ); 2, ATCC 28958 (*MAT**a*).

**B** – Isolados de *C. neoformans* de fontes ambientais - *Mating*  $\alpha$ .

### PCR-RFLP do gene URA 5

A técnica de PCR-RFLP com o gene URA 5 foi realizada para classificar os perfis genéticos. Os perfis de PCR-RFLP obtidos foram do tipo molecular VNI (sorotipo A) de acordo com a Figura 2.



**Figura 2.** Perfis de PCR-RFLP de *C. neoformans* de fontes ambientais (gel a 3%). Marcador de tamanho molecular 100pb (Promega). **A** – Gel representativo

das cepas padrão. **B, C** – Géis representativos dos isolados de *C. neoformans* de fontes ambientais de Araraquara (VNI – sorotipo A)

## **AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE DE *C. neoformans* POR DISCO-DIFUSÃO EM ÁGAR**

A avaliação da sensibilidade às drogas antifúngicas, dos 67 isolados ambientais, foi feita primeiramente pelo método de difusão em discos conforme o documento M44-A do *CLSI* (2004), empregando fluconazol, e adicionalmente itraconazol, anfotericina B e cetoconazol (tabela 1). Adotando critérios do fabricante dos discos antifúngicos, dois isolados (3%) de *C. neoformans* apresentaram padrão de resistência ao fluconazol, 36% foram classificados como intermediários e 61% sensíveis por esta metodologia. Os isolados sensíveis frente ao fluconazol apresentaram valores de diâmetro correspondentes a moda de 24 mm e média  $22,98 \pm 3,03$  mm, já os intermediários, a moda foi de 19 mm e a média  $17,62 \pm 1,58$  mm. Em relação ao itraconazol, três isolados (4,5%) apresentaram padrão intermediário com moda de 19 mm, média de  $17,67 \pm 2,31$  mm, enquanto que os demais foram classificados como sensíveis, com moda de 22 mm e média de  $25,26 \pm 3,31$  mm (Figura 3). Todos isolados foram sensíveis a anfotericina B (moda 22 mm, média  $23,20 \pm 2,51$  mm) e ao cetoconazol (moda 40 mm, média  $44,07 \pm 5,50$  mm) conforme demonstrado no quadro 1.

Quadro 1 – Resultados do teste de sensibilidade dos isolados de *C. neoformans* de fontes ambientais, frente aos antifúngicos itraconazol, fluconazol, anfotericina B e cetoconazol empregando a metodologia de difusão em discos.

Isolado	ITZ	ITZ	FLZ	FLZ	AMB	AMB	CTZ	CTZ
1	*22	S	22	S	21	S	40	S
2	23	S	24	S	23	S	47	S
3	24	S	23	S	21	S	50	S
4	32	S	28	S	25	S	55	S
5	22	S	22	S	20	S	42	S
6	24	S	21	S	22	S	43	S
7	23	S	27	S	22	S	49	S
8	31	S	29	S	24	S	55	S
9	23	S	20	S	20	S	44	S
10	28	S	25	S	24	S	60	S
11	25	S	24	S	22	S	42	S
12	31	S	32	S	26	S	60	S
13	24	S	24	S	22	S	42	S
14	21	S	14	SDD	24	S	34	S
15	27	S	24	S	22	S	45	S
16	24	S	21	S	22	S	41	S
17	25	S	23	S	23	S	45	S
18	26	S	15	SDD	25	S	42	S
19	25	S	23	S	20	S	46	S
20	29	S	25	S	22	S	60	S
21	30	S	25	S	20	S	50	S
22	27	S	25	S	19	S	56	S
23	21	S	17	SDD	26	S	40	S
24	24	S	24	S	22	S	44	S
25	22	S	23	S	21	S	42	S
26	27	S	27	S	21	S	50	S
27	27	S	23	S	24	S	42	S
28	27	S	18	SDD	24	S	40	S
29	27	S	19	SDD	22	S	40	S
30	25	S	22	S	23	S	41	S
31	24	S	25	S	22	S	45	S
32	27	S	19	SDD	22	S	43	S
33	31	S	22	S	25	S	44	S
34	25	S	20	S	23	S	44	S
35	24	S	19	SDD	21	S	40	S
36	24	S	21	S	24	S	40	S

37	21	S	19	SDD	26	S	43	S
38	26	S	19	SDD	22	S	40	S
39	22	S	19	SDD	24	S	39	S
40	19	SDD	11	R	19	S	40	S
41	15	SDD	30	S	16	S	39	S
42	20	S	11	R	27	S	41	S
43	26	S	20	S	26	S	44	S
44	30	S	21	S	27	S	45	S
45	29	S	29	S	25	S	42	S
46	29	S	19	SDD	23	S	45	S
47	25	S	19	SDD	23	S	44	S
48	22	S	19	SDD	20	S	41	S
49	30	S	25	S	22	S	46	S
50	30	S	20	S	26	S	45	S
51	24	S	24	S	24	S	45	S
52	33	S	30	S	26	S	52	S
53	29	S	26	S	20	S	45	S
54	29	S	21	S	26	S	44	S
55	24	S	15	SDD	24	S	37	S
56	21	S	16	SDD	21	S	39	S
57	22	S	18	SDD	26	S	41	S
58	21	S	16	SDD	25	S	40	S
59	22	S	16	SDD	26	S	44	S
60	21	S	17	SDD	26	S	40	S
61	28	S	23	S	23	S	51	S
62	22	S	17	SDD	29	S	44	S
63	22	S	19	SDD	27	S	41	S
64	25	S	20	S	18	S	43	S
65	20	S	18	SDD	25	S	38	S
66	22	S	19	SDD	25	S	39	S
67	19	SDD	17	SDD	25	S	36	S
ATCC	26	S	24	S	27	S	41	S

Legenda: ICZ – Itraconazol; FLZ – Fluconazol; AMB – Anfotericina B e CTZ – Cetoconazol. Critérios de Classificação para *Candida* estabelecidos pelo CLSI, documento M44-A: S = Sensível; SDD = Sensível dependente da dose; R = Resistente para fluconazol. \*Medida dos halos obtidos em milímetros. Critérios de classificação para anfotericina B, cetoconazol e itraconazol fornecidos pelo fabricante (CECON®).

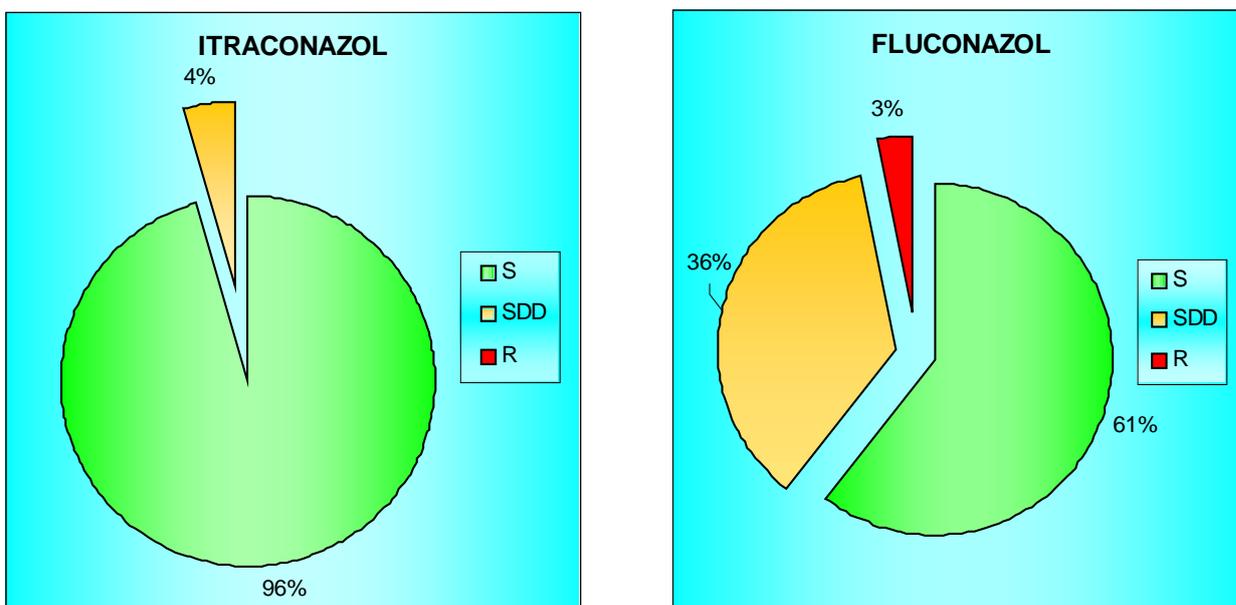


Figura 3 – Antifungigrama pelo método de difusão em discos de 67 isolados ambientais de *C. neoformans*, realizado de acordo com o documento M44-A do *CLSI* para fluconazol e classificação de acordo com a bula fornecida pelo fabricante para itraconazol. (CECON®)

	Fluconazol	Itraconazol
S = Sensível	> 19mm	≥ 20mm
I = Intermediário	19 – 14mm	19 – 12mm
R = Resistente	< 14mm	≤ 11mm

## AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE DE *C. neoformans* FRENTE À FLUCONAZOL E EXTRATOS DE PLANTAS POR MICRODILUIÇÃO.

As concentrações inibitórias dos 67 isolados de *C. neoformans* foram avaliadas pelas leituras dos controles, positivo e negativo em cada placa e também com base nas leituras da cepa de *C. neoformans* - ATCC 90012. A variação da concentração inibitória mínima para fluconazol foi de 0,125 a 16 $\mu$ g/mL, a moda 8  $\mu$ g/mL, a média e desvio padrão 8,31  $\pm$  4,45  $\mu$ g/mL. A maioria dos isolados (34/67) apresentou CIM de 8  $\mu$ g/mL. Dois isolados (40 e 42) que apresentaram perfil de resistência ao fluconazol pelo método de disco difusão em ágar foram avaliados pelo método de microdiluição e por este, o valor da CIM foi de 4 e 8  $\mu$ g/mL, respectivamente. De acordo com o teste de correlação de Spearman, os resultados obtidos pelas técnicas de disco difusão e microdiluição possuem uma ótima correlação ( $p=0,88$ ).

Para o extrato de *Alibertia macrophylla*, a CIM variou de 15,6 a 250  $\mu$ g/mL, moda 250  $\mu$ g/mL, média e desvio padrão de 198,30  $\pm$  71,13  $\mu$ g/mL e para o extrato de *Machaerium villosum* intervalo de 1,95 a 125  $\mu$ g/mL, moda 125  $\mu$ g/mL, média e desvio padrão de 82,46  $\pm$  40,97  $\mu$ g/mL de acordo com a quadro 2 e figuras 4 e 5.

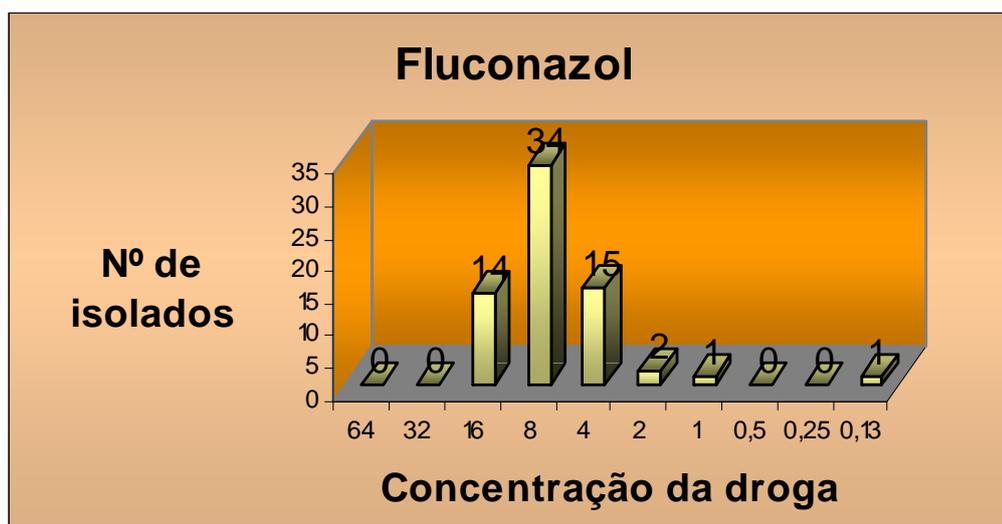


Figura 4. Distribuição dos valores de CIM (0,13 $\mu$ g/mL a 16 $\mu$ g/mL) de fluconazol para os 67 isolados de *C. neoformans* por microdiluição de acordo com o documento M27-A2 (2002) do CLSI.

Quadro 2 – Resultados dos testes de sensibilidade dos isolados de *C. neoformans* de fontes ambientais, *mating type*  $\alpha$  frente ao antifúngico fluconazol e aos extratos de *Alibertia macrophylla* e *Machaerium villosum* de acordo com o documento M27-A2 do *CLSI*.

Isolado	FLZ	A. <i>macrophylla</i>	M. <i>villosum</i> .
1	8*	250	62,5
2	4	125	31,2
3	4	250	62,5
4	<b>16</b>	<b>250</b>	<b>125</b>
5	8	250	125
6	<b>16</b>	<b>250</b>	<b>62,5</b>
7	<b>16</b>	<b>250</b>	<b>125</b>
8	4	250	62,5
9	<b>16</b>	<b>250</b>	<b>125</b>
10	8	250	62,5
11	<b>16</b>	<b>250</b>	<b>125</b>
12	<b>16</b>	<b>250</b>	<b>62,5</b>
13	8	125	62,5
14	8	250	125
15	4	125	31,2
16	2	250	125
17	8	125	15,6
18	8	250	125
19	8	250	125
20	8	250	125
21	8	250	125
22	8	125	62,5
23	<b>16</b>	<b>250</b>	<b>125</b>
24	8	125	62,5
25	8	125	62,5
26	4	125	62,5
27	<b>16</b>	<b>125</b>	<b>31,2</b>
28	8	125	62,5
29	8	250	125
30	<b>16</b>	<b>250</b>	<b>125</b>
31	8	125	62,5
32	8	125	31,2
33	8	250	125
34	8	250	125
35	8	125	62,5
36	4	250	62,5

37	8	250	125
38	<b>16</b>	<b>250</b>	<b>125</b>
39	<b>16</b>	<b>250</b>	<b>125</b>
40	4	250	125
41	4	250	125
42	8	250	125
43	8	125	62,5
44	8	125	62,5
45	0,125	31,2	3,9
46	8	250	125
47	8	250	125
48	8	250	125
49	<b>16</b>	<b>250</b>	<b>1,95</b>
50	1	15,6	7,8
51	4	125	62,5
52	4	250	125
53	8	250	125
54	2	125	31,2
55	4	250	62,5
56	8	125	62,5
57	<b>16</b>	<b>250</b>	<b>125</b>
58	4	250	62,5
59	8	250	31,2
60	8	125	62,5
61	<b>16</b>	<b>&gt;250</b>	<b>125</b>
62	8	250	62,5
63	4	62,5	31,2
64	4	125	62,5
65	4	62,5	31,2
66	8	62,5	15,6
67	8	250	62,5
ATCC	4	250	125

\* Dados expressos em µg/mL

Legenda: FLZ – Fluconazol; A.m. – *Alibertia macrophylla* e M.v. – *Machaerium villosum*.

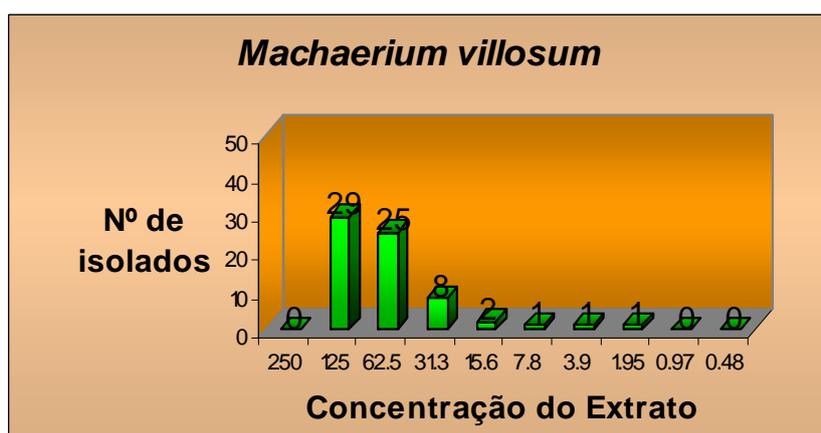
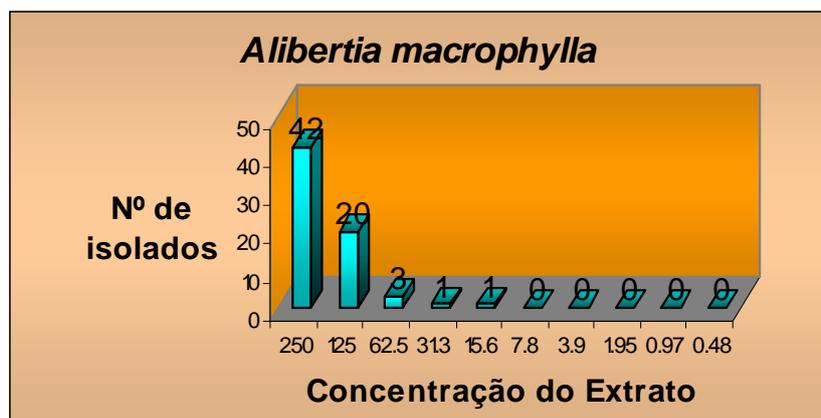


Figura 5. Distribuição dos valores de CIM (1,95µg/mL a 250µg/mL) de extratos de *Alibertia macrophylla* e *Machaerium villosum* de isolados ambientais de *C. neoformans* determinados pelo método de microdiluição de acordo com o documento M27-A2 (2002) do CLSI.

A maioria dos isolados (42/67) apresentou CIM de 250µg/mL para *A. macrophylla* e 125µg/mL em 29/67 isolados para *M. villosum*.

## **PADRONIZAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DO INÓCULO**

Na padronização do inóculo, foi feita comparação do número de leveduras obtido na contagem de uma suspensão de *C. neoformans* em salina 0,85% em câmara de Neubauer com a densidade ótica obtida pela medida da absorbância a 530nm, de três volumes de inóculo, em triplicata. O valor intermediário ( $10^6$ ) foi correspondente ao tubo número 0,5 da escala de Mcfarland e o de valor maior ( $10^8$ ) correspondia ao tubo 5 desta escala, indicando uma falta de correlação com os valores esperados, revelando a necessidade do uso de método espectrofotométrico para avaliação do inóculo.

## **ANÁLISE DA ATIVIDADE SANEANTE DE EXTRATOS VEGETAIS**

A atividade saneante dos extratos vegetais frente a *C. neoformans*, cepa de referência ATCC 90012 e cepas ambientais, foi demonstrada pela curva de sobrevivência, correspondendo às unidades formadoras de colônia da levedura frente ao extrato de *A. macrophylla*, na concentração de 500 µg/mL. Como controle foi utilizado fluconazol na concentração de 32µg/mL e hipoclorito de sódio a 2%, usado como parâmetro de mortalidade, bem como um parâmetro de sobrevivência através da ausência da adição dos itens anteriores (extrato, fluconazol e hipoclorito). As amostras foram colhidas em tempos pré-determinados e semeadas em duplicata em meio Agar Níger. Nas figuras 7 a 14 estão representadas as curvas de sobrevivência das cepas de referência de *C. neoformans* (ATCC 90012) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e das cepas ambientais de *C. neoformans*, respectivamente, após exposição ao extrato vegetal de *A. macrophylla* (1), fluconazol (2), hipoclorito (3) e com a ausência de adição (4), nos tempos de 0, 4, 12 e 24 horas (T0, T4, T12 e T24). O limite de detecção deste teste foi de 8 UFC/mL.

Para padronização da técnica foi realizada uma avaliação piloto em que se variou o inóculo desde níveis imediatamente superiores aos encontrados no ambiente ( $10^8$ ), e, por diluições seriadas, a níveis menores ( $10^4$  e  $10^2$ ) frente à cepa ATCC 90012 de *C. neoformans*. Quando foi utilizado o inóculo de  $10^2$ , o tratamento com o extrato reduziu em aproximadamente 79,6%, o número de leveduras em 24 horas, enquanto que o hipoclorito reduziu

em 98,1% no mesmo período. Na concentração de 104 a eficiência na redução desta levedura após exposição ao extrato foi de 52,4% e no caso de hipoclorito 86,9%, enquanto que na concentração de 108, a redução foi de 47,8% e de 65% respectivamente.

A levedura padrão foi inibida de forma semelhante pelo fluconazol e pelo extrato de *A. macrophylla* independente do inóculo. Os resultados estão apresentados na figura 6 e evidenciam uma faixa de ação da atividade das substâncias, além da influência do tamanho do inóculo nos resultados obtidos por esta metodologia.

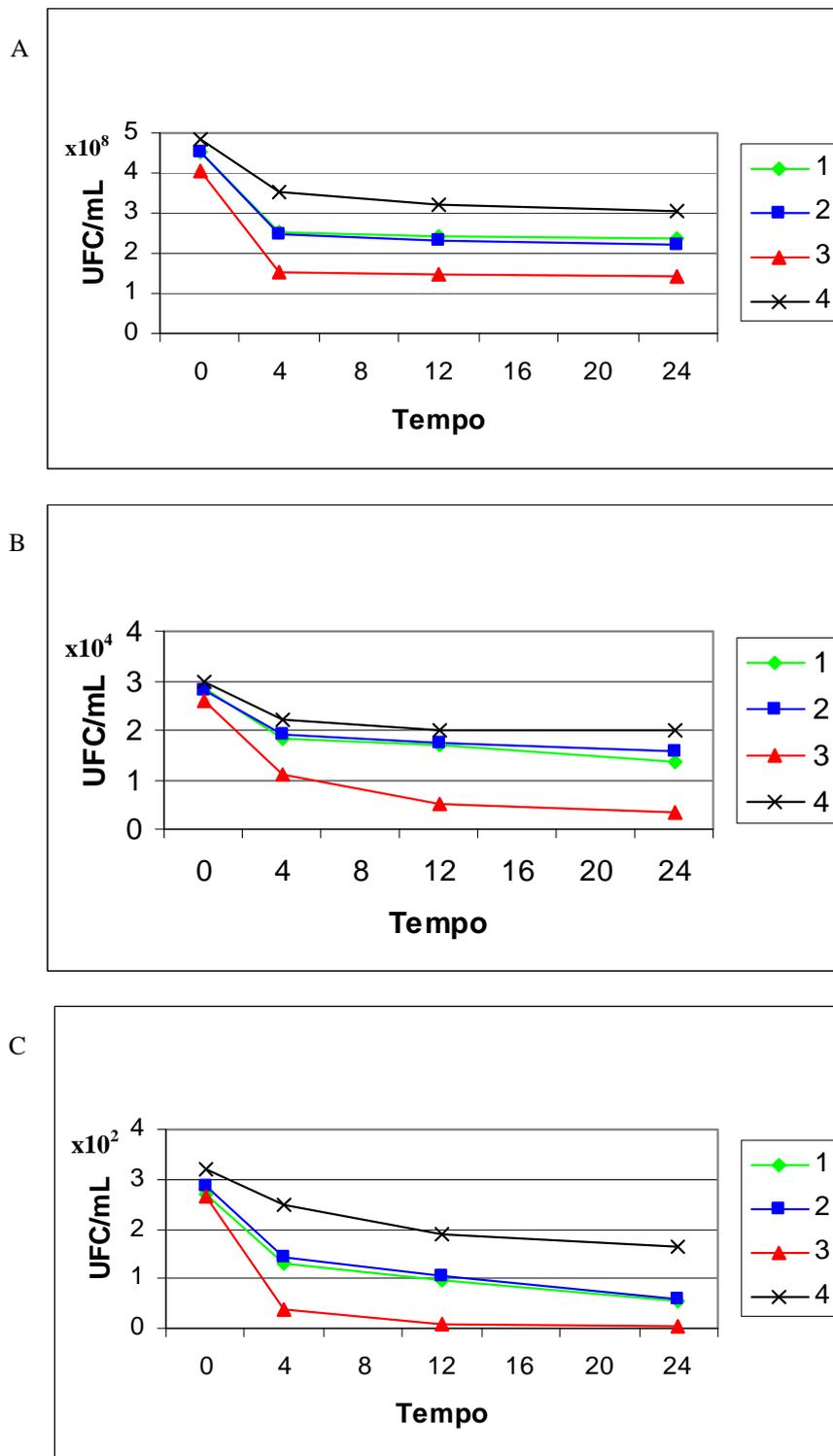


Figura 6. Curva de sobrevivência da cepa ATCC 90012 de *C. neoformans* em relação ao tempo e ao tamanho do inóculo após exposição: (1) ao extrato vegetal de *A. macrophylla* 500 µg/mL, (2) ao fluconazol 32 µg/mL, (3) ao hipoclorito de sódio (controle negativo) e (4) sem exposição a nenhum agente (controle positivo = 4). A. Inóculo de 10<sup>8</sup>. B. Inóculo de 10<sup>4</sup>. C. Inóculo de 10<sup>2</sup>.

Foi escolhido o inoculo de  $10^6$  por se constituir em condição mais semelhante ao número de leveduras encontradas no ambiente.

Para facilitar a visualização dos resultados obtidos por esta técnica, estão apresentados no quadro 3 o número de UFC recuperados em todos os pontos da cinética frente a cada substância exposta bem como na ausência de exposição. Neste quadro fica evidente a diminuição no número de colônias em relação ao tempo de exposição bem como a diferença da redução no isolamento frente a cada substância a que foram expostos os isolados ambientais e as cepas de referência. Comparando o numero de UFC obtido no tempo zero com o T24, nos casos onde houve a adição de uma substância para todas as amostras, foi observada diferença estatisticamente significativa (*Mann-Whitney*, 2-tailed,  $z = -4,783$ ,  $p \leq 0,01$ ).

No quadro 4 está descrita a eficiência de desinfecção, em porcentagem, obtidas pelo cálculo da taxa de morte de leveduras, das cepas padrão de *C. neoformans* ATCC 90012 e de *C. parapsilosis* ATCC 22019 e dos isolados ambientais após 4, 12 e 24 horas de exposição a cada substância. Dentre as substâncias avaliadas (fluconazol, extrato de *A. macrophylla* e hipoclorito de sódio) frente às cepas ambientais e as cepas padrão, hipoclorito foi a que apresentou taxa maior de eficiência em menor tempo de exposição, revelando diferença estatisticamente significante quando comparado ao tempo inicial (T0) com o T4 (*Wilcoxon*, 2-tailed,  $z = -3,409$ ,  $p \leq 0,01$ ). A taxa de eliminação das leveduras padrão de *C. neoformans* (ATCC 90012) e de *C. parapsilosis* (ATCC 22019) foram maiores frente à exposição ao extrato em todos os pontos da cinética se comparada àquela obtida pela exposição à droga antifúngica sintética.

Quadro 3. Resultado da análise da atividade saneante das cepas padrão de *C. parapsilosis* (ATCC 22019) *C. neoformans* (ATCC 90012) e de isolados ambientais de *C. neoformans* frente ao extrato de *A. macrophylla*, fluconazol e hipoclorito em relação ao tempo de 0, 4, 12 e 24 horas.

Cepas/Isolados	Substância	Tempo Zero	4 HORAS	12 HORAS	24 HORAS
ATCC 90012	Extrato	71,2 x 10 <sup>6</sup>	11,0 x 10 <sup>6</sup>	8,2 x 10 <sup>6</sup>	3,0 x 10 <sup>6</sup>
	Fluconazol	67,7 x 10 <sup>6</sup>	22,5 x 10 <sup>6</sup>	9,0 x 10 <sup>6</sup>	6,0 x 10 <sup>6</sup>
	Hipoclorito	65,7 x 10 <sup>6</sup>	7,2 x 10 <sup>6</sup>	1,0 x 10 <sup>6</sup>	7,5 x 10 <sup>5</sup>
	S/ Adição	77,2 x 10 <sup>6</sup>	44,7 x 10 <sup>6</sup>	23,5 x 10 <sup>6</sup>	22,0 x 10 <sup>6</sup>
4	Extrato	69,0 x 10 <sup>6</sup>	17,2 x 10 <sup>6</sup>	15,2 x 10 <sup>6</sup>	7,5 x 10 <sup>6</sup>
	Fluconazol	68,0 x 10 <sup>6</sup>	19,2 x 10 <sup>6</sup>	16,7 x 10 <sup>6</sup>	10,2 x 10 <sup>6</sup>
	Hipoclorito	62,7 x 10 <sup>6</sup>	10,5 x 10 <sup>6</sup>	8,0 x 10 <sup>6</sup>	7,2 x 10 <sup>5</sup>
	S/ Adição	73,2 x 10 <sup>6</sup>	46,7 x 10 <sup>6</sup>	26,2 x 10 <sup>6</sup>	25,0 x 10 <sup>6</sup>
6	Extrato	73,2 x 10 <sup>6</sup>	15,2 x 10 <sup>6</sup>	16,5 x 10 <sup>6</sup>	12,0 x 10 <sup>6</sup>
	Fluconazol	67,7 x 10 <sup>6</sup>	22,2 x 10 <sup>6</sup>	19,2 x 10 <sup>6</sup>	13,0 x 10 <sup>6</sup>
	Hipoclorito	63,2 x 10 <sup>6</sup>	9,0 x 10 <sup>6</sup>	8,2 x 10 <sup>6</sup>	7,5 x 10 <sup>6</sup>
	S/ Adição	73,2 x 10 <sup>6</sup>	46,0 x 10 <sup>6</sup>	30,0 x 10 <sup>6</sup>	23,2 x 10 <sup>6</sup>
7	Extrato	78,5 x 10 <sup>6</sup>	18,7 x 10 <sup>6</sup>	17,0 x 10 <sup>6</sup>	11,0 x 10 <sup>6</sup>
	Fluconazol	76,2 x 10 <sup>6</sup>	26,2 x 10 <sup>6</sup>	18,7 x 10 <sup>6</sup>	13,2 x 10 <sup>6</sup>
	Hipoclorito	74,5 x 10 <sup>6</sup>	17,7 x 10 <sup>6</sup>	12,2 x 10 <sup>6</sup>	11,2 x 10 <sup>6</sup>
	S/ Adição	84,7 x 10 <sup>6</sup>	46,2 x 10 <sup>6</sup>	47,0 x 10 <sup>6</sup>	44,2 x 10 <sup>6</sup>
9	Extrato	74,0 x 10 <sup>6</sup>	13,5 x 10 <sup>6</sup>	7,7 x 10 <sup>6</sup>	7,7 x 10 <sup>6</sup>
	Fluconazol	70,7 x 10 <sup>6</sup>	12,0 x 10 <sup>6</sup>	7,2 x 10 <sup>6</sup>	8,7 x 10 <sup>6</sup>
	Hipoclorito	72,5 x 10 <sup>6</sup>	6,2 x 10 <sup>6</sup>	1,2 x 10 <sup>6</sup>	1,5 x 10 <sup>6</sup>
	S/ Adição	78,7 x 10 <sup>6</sup>	46,7 x 10 <sup>6</sup>	20,5 x 10 <sup>6</sup>	21,2 x 10 <sup>6</sup>
11	Extrato	75,7 x 10 <sup>6</sup>	18,5 x 10 <sup>6</sup>	13,5 x 10 <sup>6</sup>	7,7 x 10 <sup>6</sup>
	Fluconazol	76,0 x 10 <sup>6</sup>	15,2 x 10 <sup>6</sup>	12,2 x 10 <sup>6</sup>	6,5 x 10 <sup>6</sup>
	Hipoclorito	77,7 x 10 <sup>6</sup>	8,0 x 10 <sup>6</sup>	4,7 x 10 <sup>6</sup>	4,2 x 10 <sup>6</sup>
	S/ Adição	87,7 x 10 <sup>6</sup>	49,2 x 10 <sup>6</sup>	23,7 x 10 <sup>6</sup>	23,5 x 10 <sup>6</sup>
12	Extrato	77,0 x 10 <sup>6</sup>	15,5 x 10 <sup>6</sup>	11,2 x 10 <sup>6</sup>	9,7 x 10 <sup>6</sup>
	Fluconazol	76,2 x 10 <sup>6</sup>	21,5 x 10 <sup>6</sup>	17,0 x 10 <sup>6</sup>	6,2 x 10 <sup>6</sup>
	Hipoclorito	73,2 x 10 <sup>6</sup>	12,0 x 10 <sup>6</sup>	10,5 x 10 <sup>6</sup>	5,5 x 10 <sup>6</sup>
	S/ Adição	89,2 x 10 <sup>6</sup>	51,5 x 10 <sup>6</sup>	38,5 x 10 <sup>6</sup>	39,0 x 10 <sup>6</sup>
23	Extrato	75,0 x 10 <sup>6</sup>	14,7 x 10 <sup>6</sup>	20,5 x 10 <sup>6</sup>	10,7 x 10 <sup>6</sup>
	Fluconazol	74,7 x 10 <sup>6</sup>	24,2 x 10 <sup>6</sup>	23,0 x 10 <sup>6</sup>	13,0 x 10 <sup>6</sup>

	Hipoclorito	73,7 x 10 <sup>6</sup>	10,2 x 10 <sup>6</sup>	9,0 x 10 <sup>6</sup>	7,5 x 10 <sup>6</sup>
	S/ Adição	89,7 x 10 <sup>6</sup>	50,5 x 10 <sup>6</sup>	46,0 x 10 <sup>6</sup>	44,2 x 10 <sup>6</sup>
27	Extrato	83,7 x 10 <sup>6</sup>	27,2 x 10 <sup>6</sup>	23,5 x 10 <sup>6</sup>	14,5 x 10 <sup>6</sup>
	Fluconazol	84,5 x 10 <sup>6</sup>	22,0 x 10 <sup>6</sup>	20,5 x 10 <sup>6</sup>	11,5 x 10 <sup>6</sup>
	Hipoclorito	78,2 x 10 <sup>6</sup>	14,2 x 10 <sup>6</sup>	11,0 x 10 <sup>6</sup>	9,0 x 10 <sup>6</sup>
	S/ Adição	89,7 x 10 <sup>6</sup>	44,5 x 10 <sup>6</sup>	40,7 x 10 <sup>6</sup>	39,2 x 10 <sup>6</sup>
30	Extrato	82,2 x 10 <sup>6</sup>	23,5 x 10 <sup>6</sup>	22,0 x 10 <sup>6</sup>	12,2 x 10 <sup>6</sup>
	Fluconazol	78,7 x 10 <sup>6</sup>	28,0 x 10 <sup>6</sup>	24,0 x 10 <sup>6</sup>	15,0 x 10 <sup>6</sup>
	Hipoclorito	74,7 x 10 <sup>6</sup>	7,7 x 10 <sup>6</sup>	2,7 x 10 <sup>6</sup>	2,7 x 10 <sup>6</sup>
	S/ Adição	91,5 x 10 <sup>6</sup>	47,5 x 10 <sup>6</sup>	45,7 x 10 <sup>6</sup>	42,7 x 10 <sup>6</sup>
38	Extrato	81,2 x 10 <sup>6</sup>	36,7 x 10 <sup>6</sup>	25,2 x 10 <sup>6</sup>	17,0 x 10 <sup>6</sup>
	Fluconazol	83,2 x 10 <sup>6</sup>	33,7 x 10 <sup>6</sup>	22,7 x 10 <sup>6</sup>	14,0 x 10 <sup>6</sup>
	Hipoclorito	75,7 x 10 <sup>6</sup>	11,5 x 10 <sup>6</sup>	9,0 x 10 <sup>6</sup>	9,5 x 10 <sup>6</sup>
	S/ Adição	87,2 x 10 <sup>6</sup>	49,7 x 10 <sup>6</sup>	45,2 x 10 <sup>6</sup>	47,2 x 10 <sup>6</sup>
39	Extrato	71,2 x 10 <sup>6</sup>	26,0 x 10 <sup>6</sup>	15,5 x 10 <sup>6</sup>	17,0 x 10 <sup>6</sup>
	Fluconazol	72,7 x 10 <sup>6</sup>	26,7 x 10 <sup>6</sup>	15,2 x 10 <sup>6</sup>	13,5 x 10 <sup>6</sup>
	Hipoclorito	72,0 x 10 <sup>6</sup>	12,0 x 10 <sup>6</sup>	10,5 x 10 <sup>6</sup>	9,5 x 10 <sup>6</sup>
	S/ Adição	80,7 x 10 <sup>6</sup>	44,0 x 10 <sup>6</sup>	32,0 x 10 <sup>6</sup>	29,5 x 10 <sup>6</sup>
49	Extrato	72,5 x 10 <sup>6</sup>	16,2 x 10 <sup>6</sup>	14,0 x 10 <sup>6</sup>	8,7 x 10 <sup>6</sup>
	Fluconazol	63,5 x 10 <sup>6</sup>	15,0 x 10 <sup>6</sup>	13,2 x 10 <sup>6</sup>	9,7 x 10 <sup>6</sup>
	Hipoclorito	63,5 x 10 <sup>6</sup>	8,7 x 10 <sup>6</sup>	8,2 x 10 <sup>6</sup>	5,2 x 10 <sup>6</sup>
	S/ Adição	80,7 x 10 <sup>6</sup>	44,5 x 10 <sup>6</sup>	33,5 x 10 <sup>6</sup>	30,0 x 10 <sup>6</sup>
57	Extrato	74,5 x 10 <sup>6</sup>	4,5 x 10 <sup>6</sup>	3,7 x 10 <sup>6</sup>	4,2 x 10 <sup>6</sup>
	Fluconazol	70,2 x 10 <sup>6</sup>	13,2 x 10 <sup>6</sup>	9,0 x 10 <sup>6</sup>	7,0 x 10 <sup>6</sup>
	Hipoclorito	70,7 x 10 <sup>6</sup>	2,0 x 10 <sup>6</sup>	2,2 x 10 <sup>6</sup>	1,7 x 10 <sup>6</sup>
	S/ Adição	80,0 x 10 <sup>6</sup>	48,2 x 10 <sup>6</sup>	27,7 x 10 <sup>6</sup>	25,0 x 10 <sup>6</sup>
61	Extrato	86,5 x 10 <sup>6</sup>	35,7 x 10 <sup>6</sup>	33,2 x 10 <sup>6</sup>	25,0 x 10 <sup>6</sup>
	Fluconazol	83,2 x 10 <sup>6</sup>	34,2 x 10 <sup>6</sup>	32,5 x 10 <sup>6</sup>	21,0 x 10 <sup>6</sup>
	Hipoclorito	83,2 x 10 <sup>6</sup>	17,0 x 10 <sup>6</sup>	16,7 x 10 <sup>6</sup>	13,7 x 10 <sup>6</sup>
	S/ Adição	96,5 x 10 <sup>6</sup>	64,0 x 10 <sup>6</sup>	67,2 x 10 <sup>6</sup>	63,5 x 10 <sup>6</sup>
ATCC 22019	Extrato	88,5 x 10 <sup>6</sup>	27,2 x 10 <sup>6</sup>	24,0 x 10 <sup>6</sup>	27,0 x 10 <sup>6</sup>
	Fluconazol	89,5 x 10 <sup>6</sup>	30,2 x 10 <sup>6</sup>	28,7 x 10 <sup>6</sup>	29,2 x 10 <sup>6</sup>
	Hipoclorito	82,5 x 10 <sup>6</sup>	13,2 x 10 <sup>6</sup>	12,7 x 10 <sup>6</sup>	10,2 x 10 <sup>6</sup>
	S/ Adição	97,2 x 10 <sup>6</sup>	66,5 x 10 <sup>6</sup>	63,2 x 10 <sup>6</sup>	63,2 x 10 <sup>6</sup>

Quadro 4. Resultado da eficiência de desinfecção expressa em porcentagem de morte das cepas padrão *C. parapsilosis* (ATCC 22019) *C. neoformans* (ATCC 90012) e de isolados ambientais de *C. neoformans* frente ao extrato de *A. macrophylla*, fluconazol e hipoclorito em relação ao tempo de 0, 4, 12 e 24 horas.

Cepas/Isolados	SUBSTÂNCIA	4 HORAS	12 HORAS	24 HORAS
ATCC 90012	Extrato	84,5%	88,4%	95,8%
	Fluconazol	66,8%	86,7%	91,1%
	Hipoclorito	89,0%	98,5%	98,6%
4	Extrato	75,0%	77,9%	89,1%
	Fluconazol	71,7%	75,4%	85,0%
	Hipoclorito	83,3%	87,251	98,8%
6	Extrato	79,2%	77,5%	83,6%
	Fluconazol	67,2%	71,6%	80,8%
	Hipoclorito	85,8%	87,0%	88,1%
7	Extrato	76,1%	78,3%	86,0%
	Fluconazol	65,6%	75,4%	82,6%
	Hipoclorito	76,2%	83,6%	84,9%
9	Extrato	81,8%	89,5%	89,5%
	Fluconazol	83,0%	89,8%	87,6%
	Hipoclorito	91,4%	98,3%	97,9%
11	Extrato	75,6%	82,2%	89,8%
	Fluconazol	79,9%	83,9%	91,4%
	Hipoclorito	89,7%	93,9%	94,5%
12	Extrato	79,9%	85,4%	87,3%
	Fluconazol	71,8%	77,7%	91,8%
	Hipoclorito	83,6%	85,7%	92,5%
23	Extrato	80,3%	72,7%	85,7%
	Fluconazol	67,6%	69,2%	82,6%
	Hipoclorito	86,1%	87,8%	89,8%

27	Extrato	67,5%	71,9%	82,7%
	Fluconazol	74,0%	75,7%	86,4%
	Hipoclorito	81,8%	85,9%	88,5%
30	Extrato	71,4%	73,2%	85,1%
	Fluconazol	64,4%	69,5%	81,0%
	Hipoclorito	89,6%	96,3%	96,3%
38	Extrato	54,8%	69,0%	79,1%
	Fluconazol	59,5%	72,8%	83,2%
	Hipoclorito	84,9%	88,1%	87,5%
39	Extrato	63,5%	78,2%	76,1%
	Fluconazol	63,2%	79,0%	81,4%
	Hipoclorito	83,4%	85,4%	86,8%
49	Extrato	77,6%	80,7%	87,9%
	Fluconazol	76,8%	79,1%	84,6%
	Hipoclorito	86,2%	87,0%	91,7%
57	Extrato	94,0%	95,0%	94,3%
	Fluconazol	81,1%	87,1%	90,0%
	Hipoclorito	97,2%	96,8%	97,5%
61	Extrato	58,7%	61,6%	71,1%
	Fluconazol	58,9%	61,0%	74,8%
	Hipoclorito	79,6%	79,9%	83,5%
ATCC 22019	Extrato	69,2%	72,9%	69,5%
	Fluconazol	66,2%	67,9%	67,3%
	Hipoclorito	83,9%	84,5%	87,6%

Decorridas 24 horas de exposição ao extrato (T24), os isolados ambientais apresentaram eficiência de eliminação que variou entre 71,1% (61) e 94,3% (57), e nos isolados 4, 6, 7, 9, 23, 30, 49 e 57, a eficiência de eliminação quando expostas ao extrato vegetal, foi maior que a apresentada pela exposição ao fluconazol, de forma semelhante às cepas padrão, indicando maior sensibilidade ao extrato. Tal fato também pode ser observado na grande maioria dos isolados avaliados (11/16) após quatro e 12 horas de exposição.

Na figura 7 está expressa a curva de sobrevivência da cepa padrão de *C. neoformans* (ATCC 90012) frente ao extrato de *A. macrophylla* na concentração de 500µg/mL, mesma concentração testada com os isolados ambientais, assim como frente ao fluconazol e hipoclorito. Houve declínio na recuperação do número de UFC frente ao extrato de *A. macrophylla* (500 µg/mL) até a vigésima quarta hora, sendo recuperadas  $71,2 \times 10^6$  UFC/mL no primeiro ponto (T0) frente a  $3 \times 10^6$  UFC/mL na vigésima quarta hora (quarto ponto da cinética - T24) representando eficiência significativa de 95,8% na eliminação deste microrganismo ( $E = 95,8\%$ ) (*Mann-Whitney*, 2-tailed,  $z=2,309$ ,  $p \leq 0,01$ ). Quando da exposição da cepa padrão de *C. neoformans* ao fluconazol houve decréscimo no número de UFC (T0:  $67,7 \times 10^6$  UFC/mL → T4:  $22,5 \times 10^6$  UFC/mL → T24:  $6 \times 10^6$  UFC/mL) com eficiência significativa de  $E=66,8\%$  nas primeiras quatro horas e  $E = 91,1\%$  após 24 horas de exposição (T0 → T4; T0 → T24; *Mann-Whitney*, 2-tailed,  $z=-1,549$ ,  $p \leq 0,01$ ). No T4, o declínio observado na curva 1 (extrato) é maior (T0:  $71,2 \times 10^6$  UFC/mL → T4:  $11 \times 10^6$  UFC/mL) com eficiência significativa de 84,5% (*Mann-Whitney*, 2-tailed,  $z=-1,548$ ,  $p \leq 0,01$ ). Frente ao hipoclorito (curva 3), a cepa ATCC 90012 mostrou declínio de forma constante e significativa até a décima segunda hora de exposição, e apresentou número menor de UFC/mL recuperadas (T12:  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL), com taxa de eficiência de  $E = 98,5\%$  e  $E=98,6\%$  após 12 e 24 horas de exposição, respectivamente (*Mann-Whitney*, 2-tailed,  $z=-1,549$ ,  $p \leq 0,01$ ). O controle de sobrevivência (curva 4), quando comparado aos outros parâmetros de exposição, apresentou maior recuperação em todos os tempos, fato que também pôde ser observado nos isolados ambientais, em que, sob a mesma condição de exposição foram recuperados leveduras em concentrações semelhantes ao da cepa padrão de *C. neoformans*. Já a cepa padrão de *C. parapsilosis* (ATCC 22019), ensaiada nas mesmas condições, apresentou

sensibilidade menor ao extrato, semelhante ao isolado ambiental 61. Decorridas 24 horas de exposição, o menor índice de eficiência foi obtido frente a esta cepa, seja frente à droga antifúngica ou ao extrato (*Wilcoxon*, 2-tailed,  $z=-1,342$ ,  $p=0,180$ ). Em todos os pontos da cinética o índice de eficiência de eliminação foi discretamente maior após exposição ao extrato, quando comparado ao fluconazol, de forma semelhante à cepa padrão de *C. neoformans*. Frente ao extrato houve decréscimo no número de colônias até a décima segunda hora (T0:  $88,5 \times 10^6$  UFC/mL → T4:  $27,2 \times 10^6$  UFC/mL → T12:  $24,0 \times 10^6$  UFC/mL), e na vigésima quarta hora voltou a ser recuperada quantidade semelhante à quarta hora de exposição (T24:  $27 \times 10^6$  UFC/mL). Situação semelhante pôde ser observada frente ao fluconazol, mas não ao hipoclorito onde o decréscimo ocorreu até a vigésima quarta hora.

A eficiência de eliminação das leveduras após 24 horas de exposição ao extrato foi maior frente à cepa padrão de *C. neoformans* ATCC 90012 se comparadas aos isolados ambientais na mesma condição de exposição (E = 95,8%) (figuras 8 a 14). A cepa ATCC de *C. neoformans*, após 24 horas de exposição ao fluconazol, a recuperação foi de  $6 \times 10^6$  UFC/mL (figura 7), frente a variação de  $6,2 \times 10^6$  UFC/mL (12) a  $21 \times 10^6$  UFC/mL (61) (figuras 10 e 14). Entre as ambientais, a 61 apresentou a menor taxa de efetividade para eliminação, seja frente ao antifúngico ou ao extrato. Quando expostas ao extrato, foram recuperadas  $11 \times 10^6$  UFC/mL da cepa de *C. neoformans* ATCC e  $27 \times 10^6$  UFC/mL da cepa de *C. parapsilosis* após 4 horas, frente a uma variação de  $4,5 \times 10^6$  UFC/mL (amostra 57) a  $36,7 \times 10^6$  UFC/mL (amostra 38) dos isolados ambientais para este ponto (T4) (figuras 7, 12 e 14). Em todas as leveduras ensaiadas, após exposição ao hipoclorito foi recuperado o menor número de colônias em todos os pontos da cinética. Após a quarta hora foram recuperadas  $7,2 \times 10^6$  UFC/mL da cepa padrão de *C. neoformans*, e  $2 \times 10^6$  UFC/mL com a cepa 57 (figura 14), número menor de UFC/mL recuperadas entre os isolados ambientais neste ponto. No quarto ponto da cinética (T4) foram recuperadas  $44,7 \times 10^6$  UFC/mL da cepa padrão de *C. neoformans*, e da amostra ambiental foi obtida  $64 \times 10^6$  UFC/mL (amostra 61), (figura 14).

Nas figuras 8 a 14 estão expressas as curvas de sobrevivência dos isolados ambientais de *C. neoformans*. Com exposição à concentração de 500  $\mu$ g/mL de *A. macrophylla*, o declínio da curva pode ser observado a partir do

primeiro ponto da cinética de exposição ao extrato (T0), acentuando-se até o T24. Nas primeiras quatro horas de exposição dos isolados ambientais ao extrato houve redução de  $70 \times 10^6$  UFC/mL para aproximadamente  $10 \times 10^6$  UFC/mL, exceto nos isolados 27, 30, 38, 39 e 61 indicando menor sensibilidade. Após 12 horas de exposição dos isolados ambientais ao extrato ou à droga antifúngica, aproximadamente  $20 \times 10^6$  UFC/mL foram recuperadas das amostras 23, 27, 30, 38 e 61; e somente do isolado 61 obtivemos estes níveis após 24 horas de exposição indicando que provavelmente este seja o isolado menos sensível entre as avaliadas neste estudo. Este dado vem de encontro ao observado quando se avaliaram estes isolados pelo teste de sensibilidade.

Houve decréscimo das colônias com o passar do tempo, por vezes irregular, mas em todas as situações em que os isolados foram expostos ao extrato, ao hipoclorito ou ao antifúngico. Comparando todos os isolados, a diminuição da contagem de colônias foi menor (maior recuperação de UFC) das alíquotas provenientes dos tubos onde não houve adição de substâncias (extrato, fluconazol e hipoclorito) (controle de sobrevivência) em todos os tempos, assim como as alíquotas provenientes dos tubos que foram adicionados de hipoclorito apresentaram o menor número na recuperação de UFC. Frente ao hipoclorito de sódio (curva 3), os isolados ambientais de *C. neoformans* declinaram acentuadamente do tempo zero (T0) até a quarta hora de exposição à esta substância, já a cepa padrão declinou até a décima segunda hora, onde aparentemente estabilizou.

No ensaio com os isolados ambientais, a inibição pelo extrato ocorreu em quantidades semelhantes às obtidas pelo fluconazol, apresentando muitas vezes uma curva semelhante à obtida com a exposição ao antifúngico. Ambos, extrato e antifúngico, inibiram gradativamente a recuperação das colônias. Tanto frente à cepa padrão quanto aos isolados ambientais 6, 7, 12, 23 e 57 a inibição causada pelo extrato foi maior que a provocada pelo antifúngico, decorridas quatro horas e, neste último isolado (57) a recuperação foi menor em todos os pontos da cinética (figuras 6, 8, 9, 12, 13). A inibição dos isolados ambientais de *C. neoformans* frente à droga com atividade antifúngica, fluconazol, na concentração de  $32 \mu\text{g/mL}$  (2) variou de isolado para isolado. Nesta concentração ( $32 \mu\text{g/mL}$ ) foi observado declínio na recuperação do

número de UFC até a quarta hora de exposição a esta droga antifúngica. Nas amostras 12, 38, 39 e 61, decorridas 24 horas de exposição, o antifúngico inibiu mais que o extrato, recuperando um número menor de colônias dos isolados expostos à droga (figuras 10, 12, 13 e 14). Com a exposição dos isolados ambientais ao extrato de *A. macrophylla* ou ao antifúngico fluconazol, houve o declínio da curva em todas as concentrações, por vezes, com aparente estabilização ou nova recuperação da levedura em tempos posteriores.

Na figura 15 estão representados os valores da média e da mediana dos isolados testados. Nesta figura fica evidente a diminuição do número de UFC/mL no decorrer do tempo, frente todas as substâncias a que os isolados foram expostos, inclusive à que não houve adição de substância. Correlacionando as variáveis de tempo de exposição com as substâncias a que os isolados foram submetidos ao contato, bem como com o número de UFC/mL recuperados o teste de correlação de *Pearson*, mostra que quanto maior o tempo de exposição, menor o número de UFC recuperadas apresentando significativa correlação entre as variáveis (*Pearson*, 2-tailed,  $z=-0.647$ ,  $p\leq 0,01$ ). Diferenças significativas foram observadas entre o tempo zero e após 24 horas de exposição (*Wilcoxon*, 2-tailed,  $z=-4.783$ ,  $p\leq 0,01$ ). A interferência no crescimento causada pela adição das substâncias ao inóculo foi evidenciada desde o tempo zero.

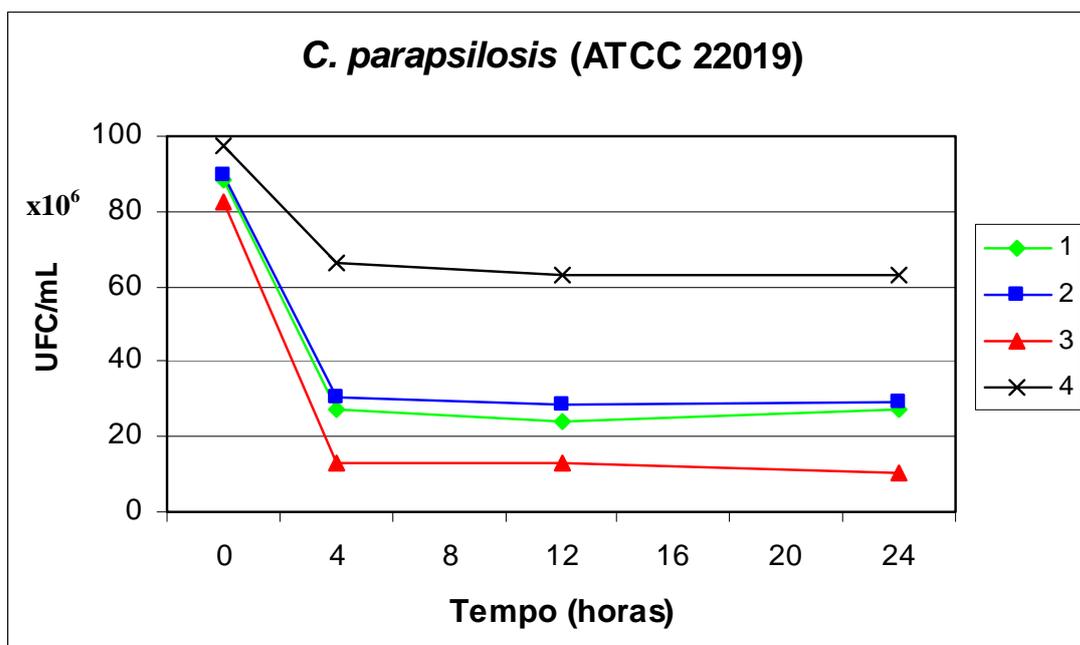
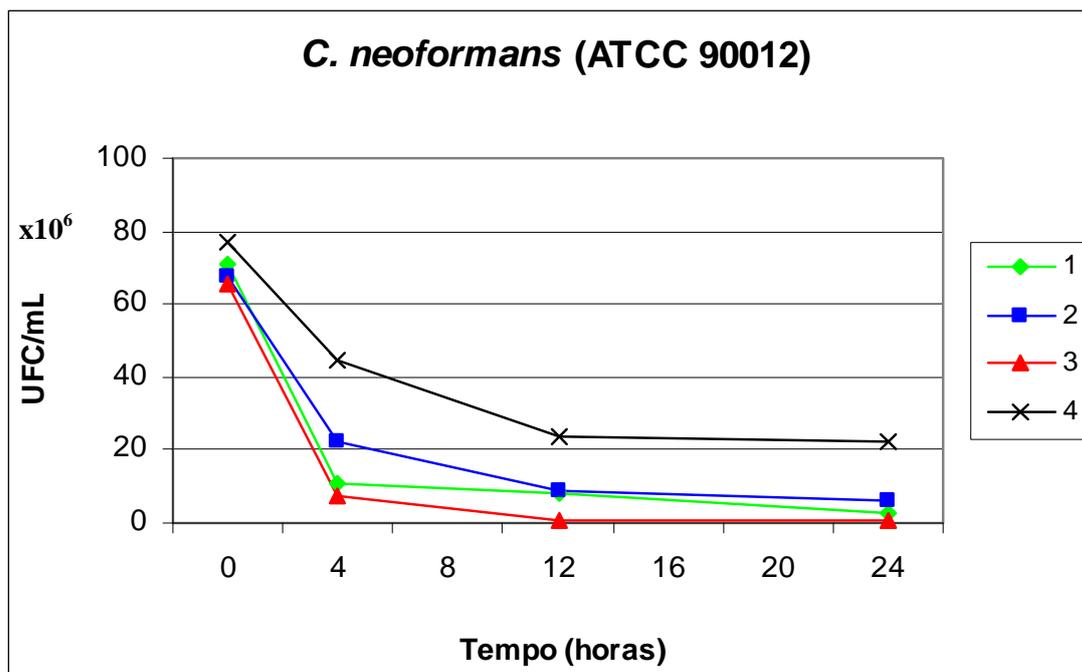


Figura 7 – Curva de sobrevivência das cepas padrão de *C. neoformans* (ATCC 90012) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019) em relação ao tempo após exposição ao extrato vegetal de *A. macrophylla* 500 µg/mL (1), ao fluconazol 32 µg/mL (2), ao hipoclorito de sódio (controle negativo = 3) e sem exposição a nenhum agente (controle positivo = 4).

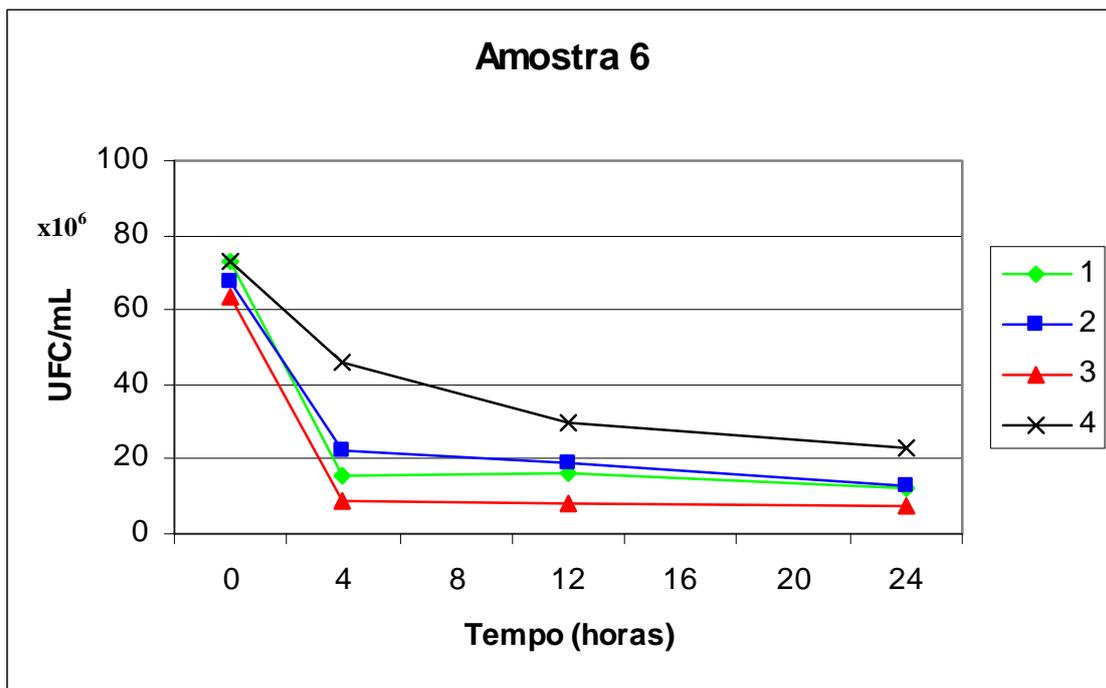
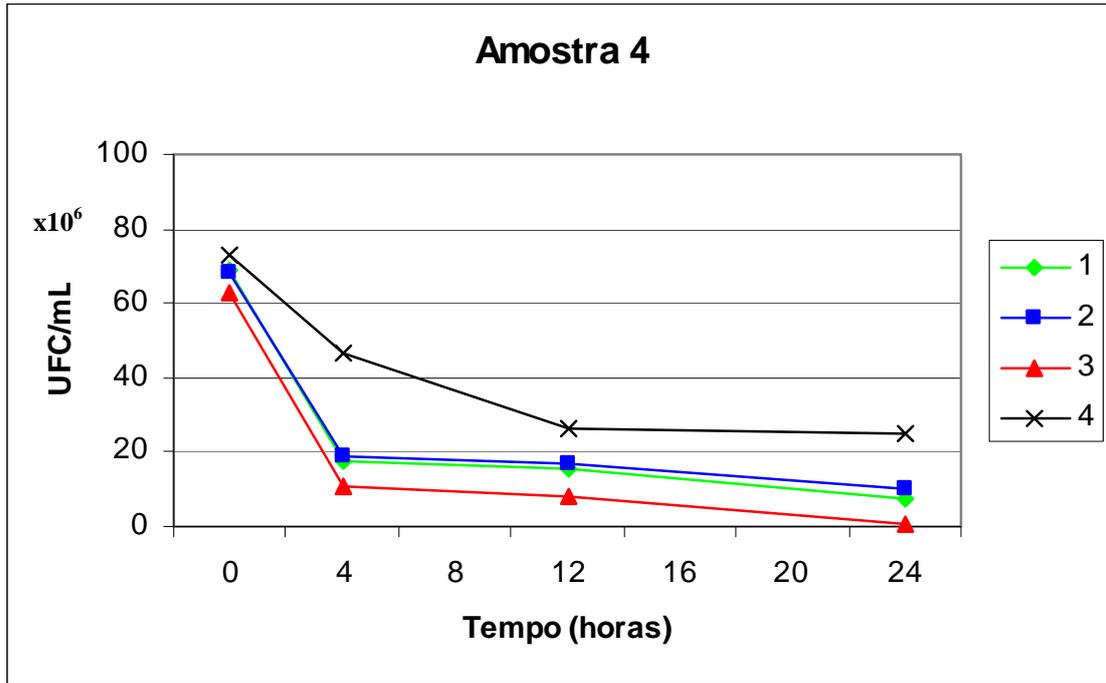


Figura 8 – Curva de sobrevivência dos isolados ambientais 4 e 6 de *C.neoformans* em relação ao tempo após exposição ao extrato vegetal de *A. macrophylla* 500 µg/mL (1), ao fluconazol 32 µg/mL (2), ao hipoclorito de sódio (3) e sem exposição a nenhum agente (controle 4).

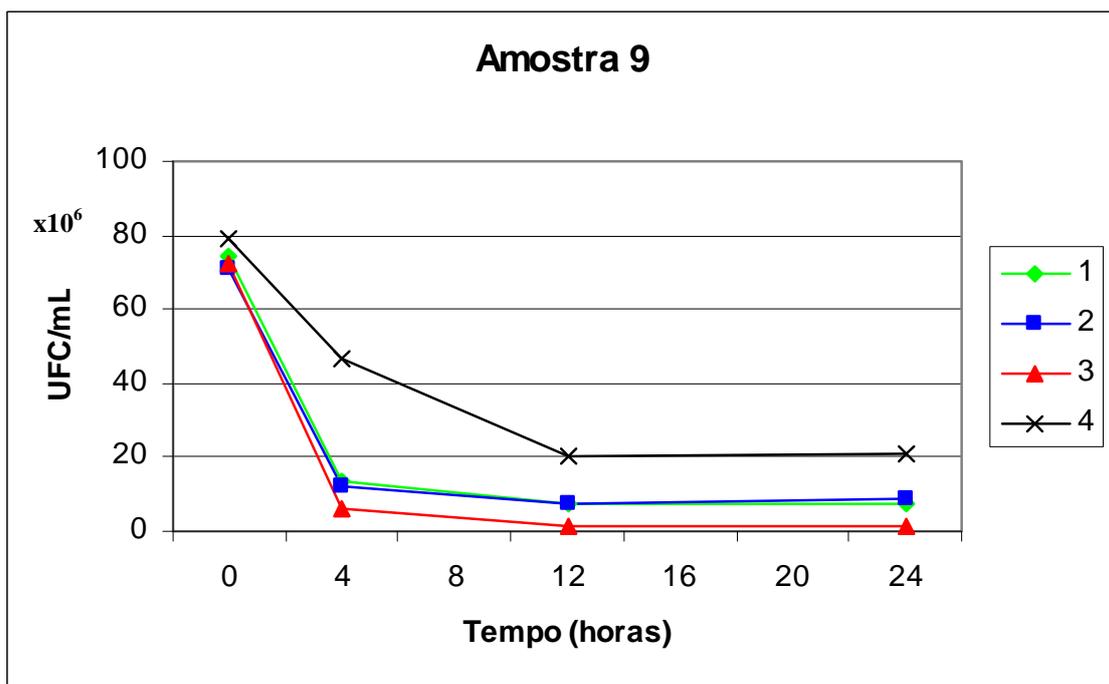
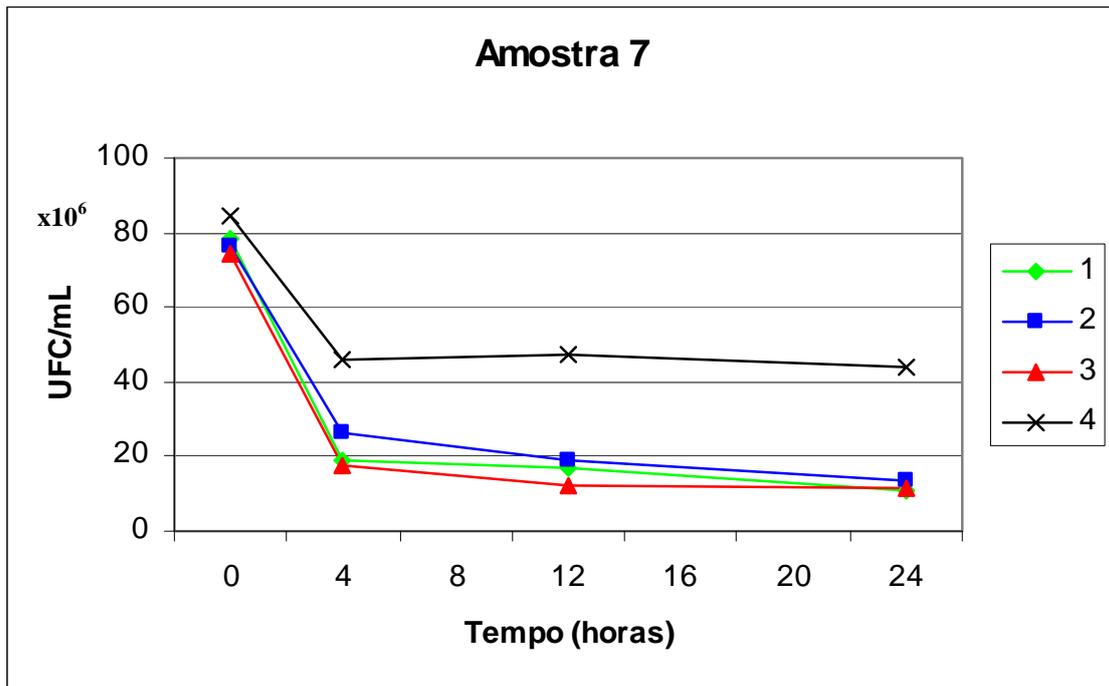


Figura 9 – Curva de sobrevivência dos isolados ambientais 7 e 9 de *C.neoformans* em relação ao tempo após exposição ao extrato vegetal de *A. macrophylla* 500 µg/mL (1), ao fluconazol 32 µg/mL (2), ao hipoclorito de sódio (3) e sem exposição a nenhum agente (controle = 4).

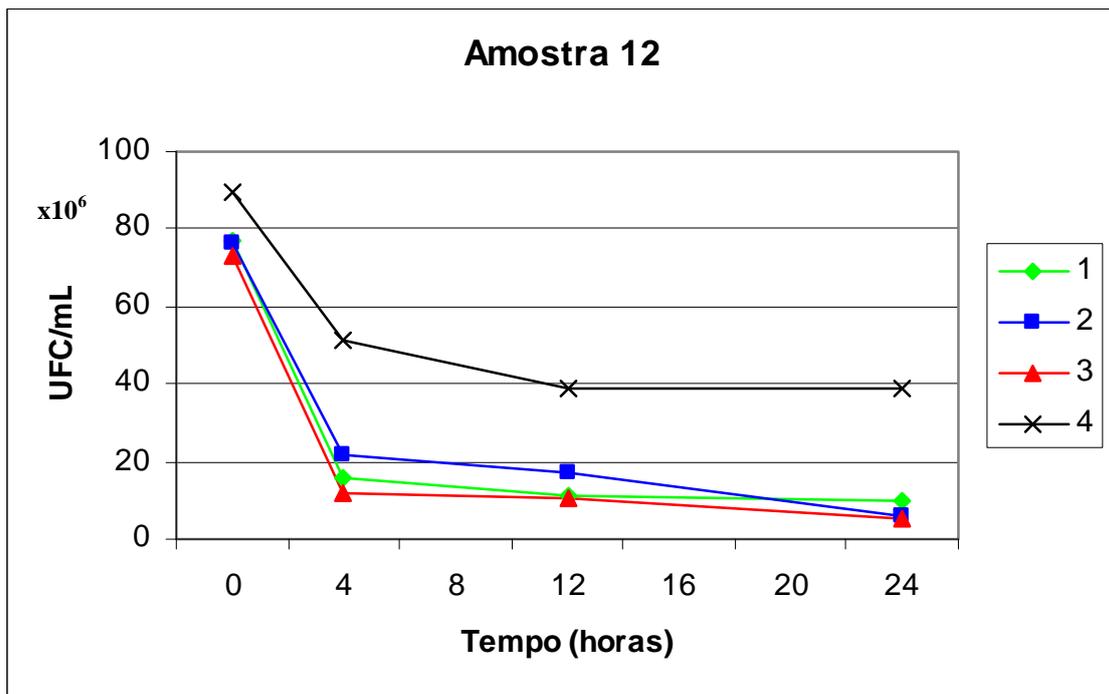
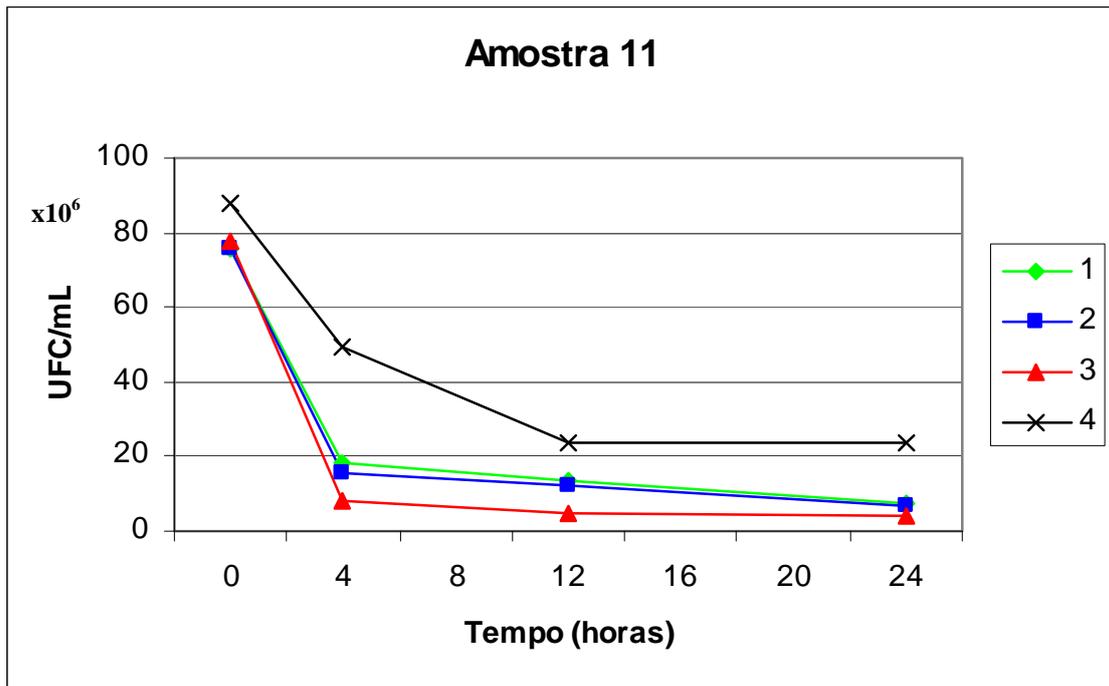


Figura 10 – Curva de sobrevivência dos isolados ambientais 11 e 12 de *C. neoformans* em relação ao tempo após exposição ao extrato vegetal de *A. macrophylla* 500 µg/mL (1), ao fluconazol 32 µg/mL (2), ao hipoclorito de sódio (3) e sem exposição a nenhum agente (controle = 4).

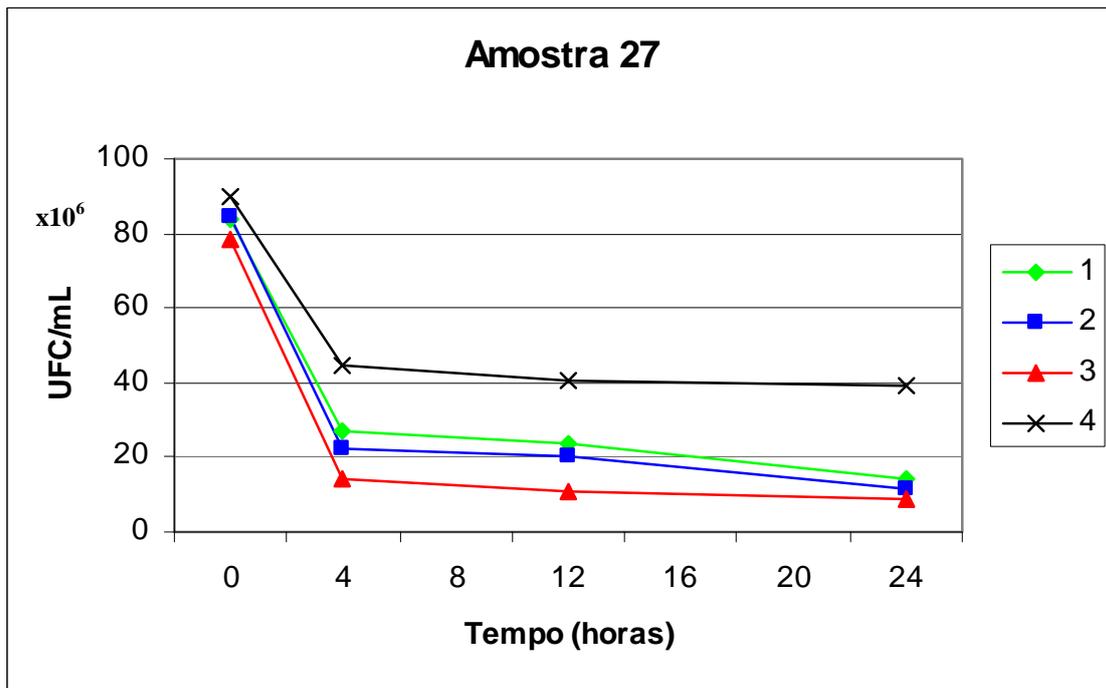
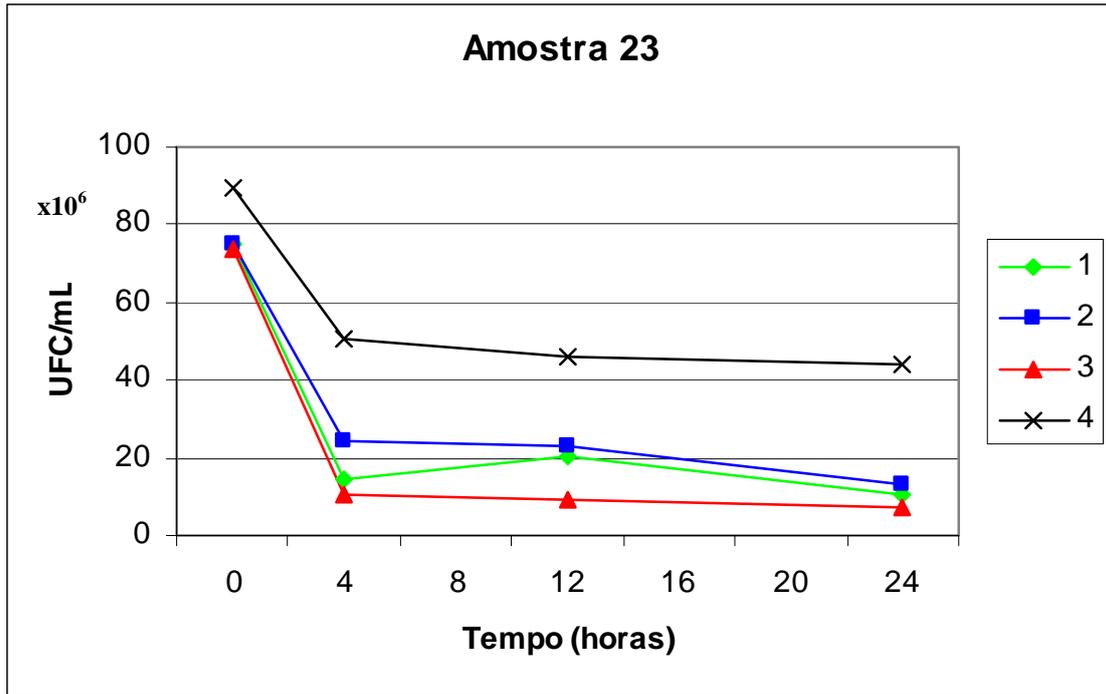


Figura 11 – Curva de sobrevivência dos isolados ambientais 23 e 27 de *C. neoformans* em relação ao tempo, após exposição ao extrato vegetal de *A. macrophylla* 500 µg/mL (1), ao fluconazol 32 µg/mL (2), ao hipoclorito de sódio (3) e sem exposição a nenhum agente (controle = 4).

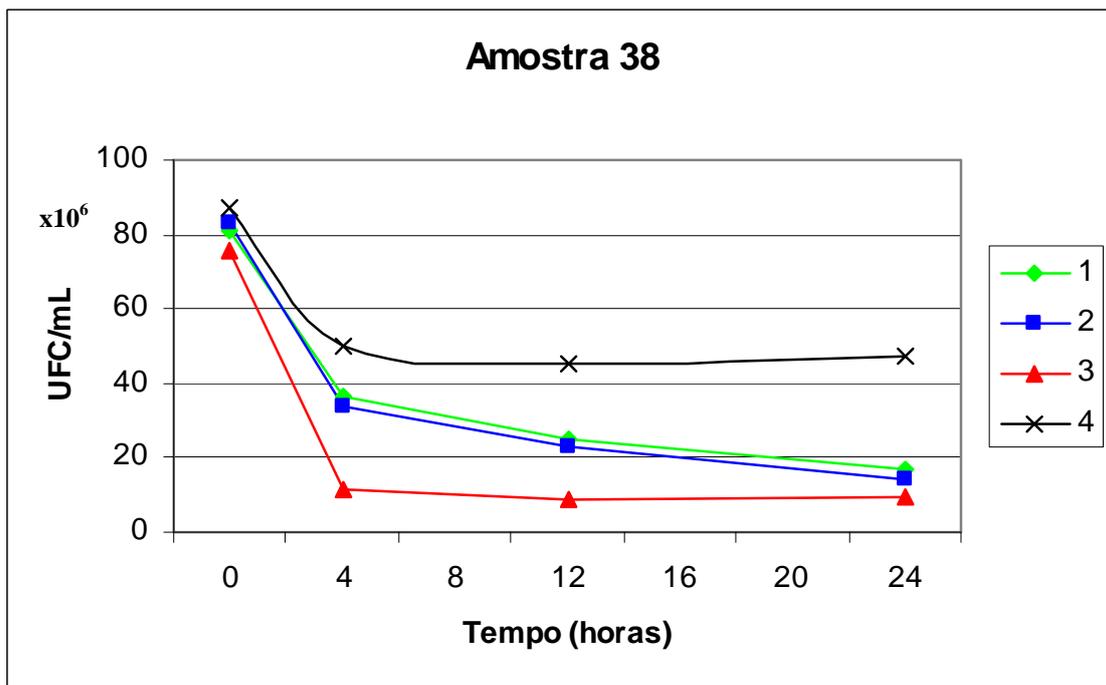
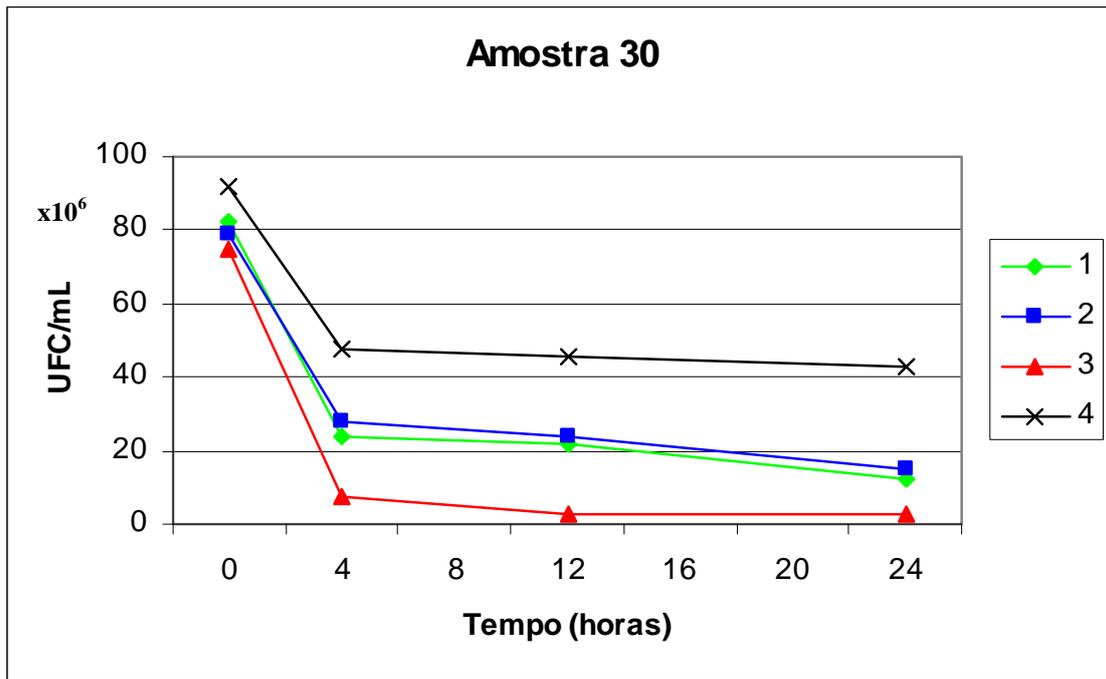


Figura 12 – Curva de sobrevivência dos isolados ambientais 30 e 38 de *C. neoformans* em relação ao tempo após exposição ao extrato vegetal de *A. macrophylla* 500 µg/mL (1), ao fluconazol 32 µg/mL (2), ao hipoclorito de sódio (3) e sem exposição a nenhum agente (controle = 4).

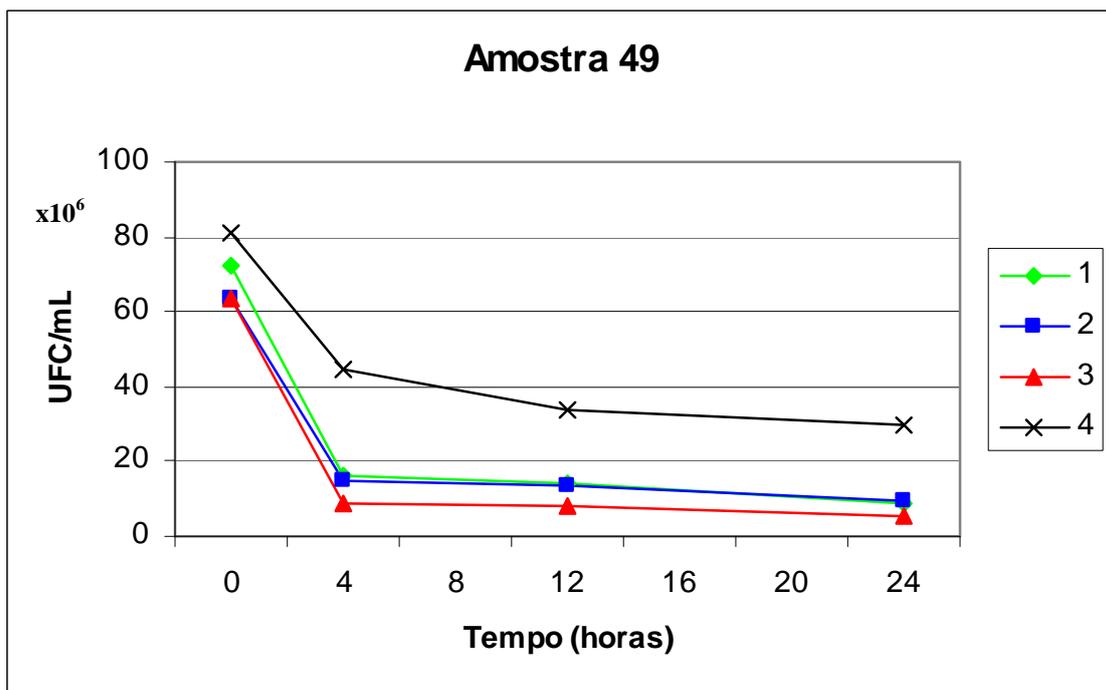
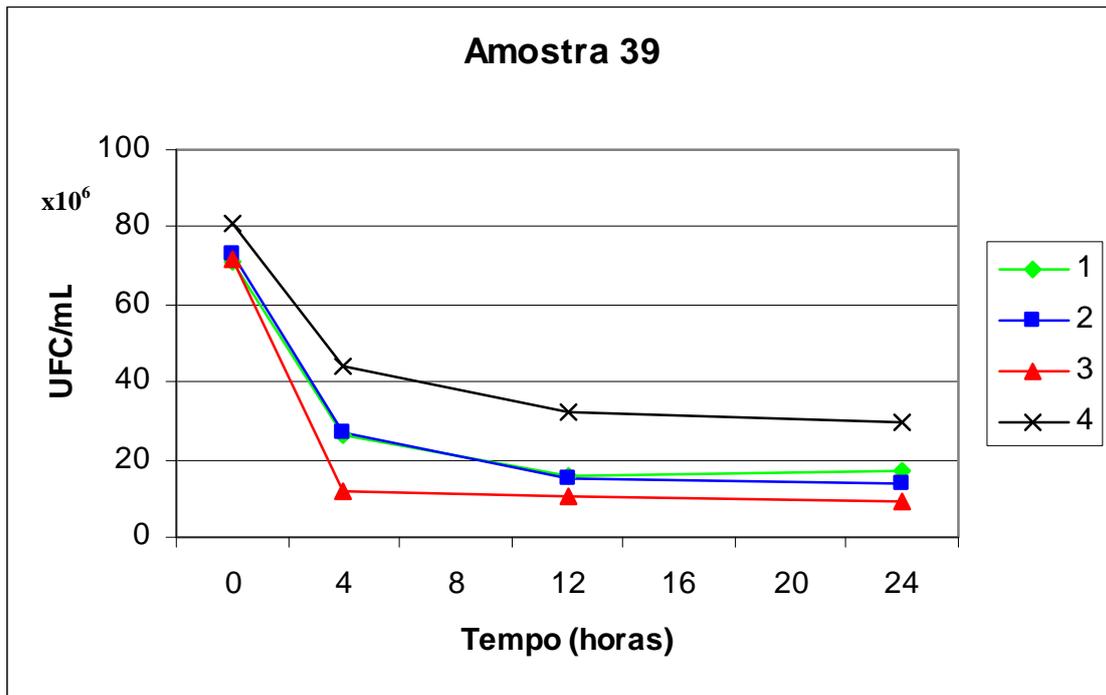


Figura 13 – Curva de sobrevivência dos isolados ambientais 40 e 49 de *C. neoformans* em relação ao tempo após exposição ao extrato vegetal de *A. macrophylla* 500 µg/mL (1), ao fluconazol 32 µg/mL (2), ao hipoclorito de sódio (3) e sem exposição a nenhum agente (controle = 4).

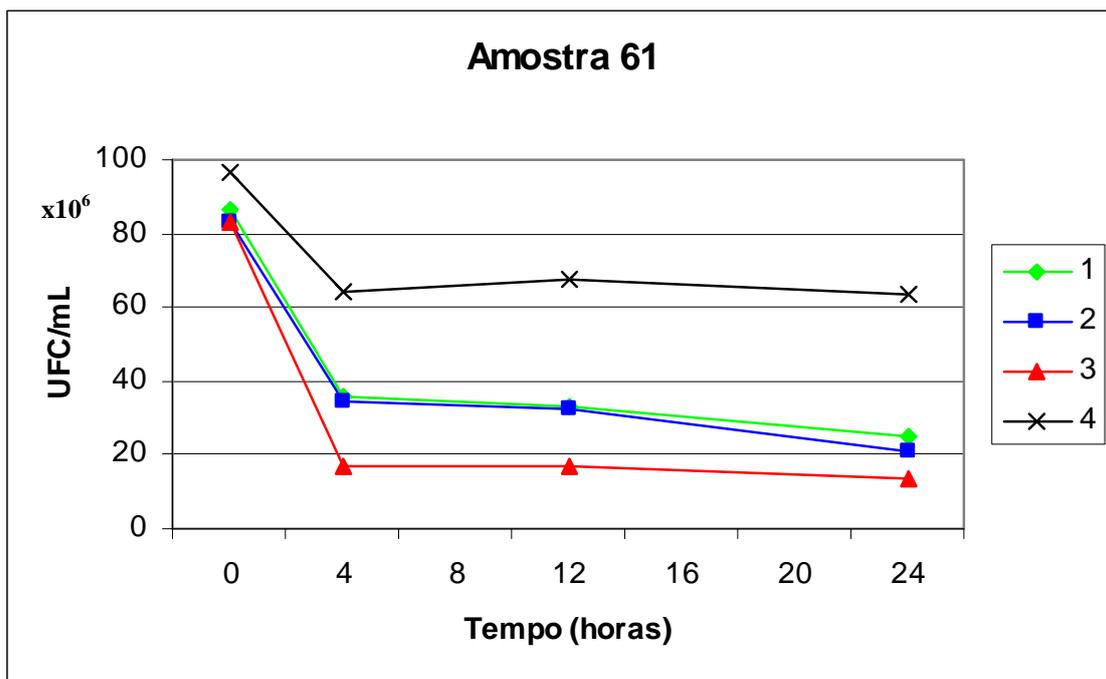
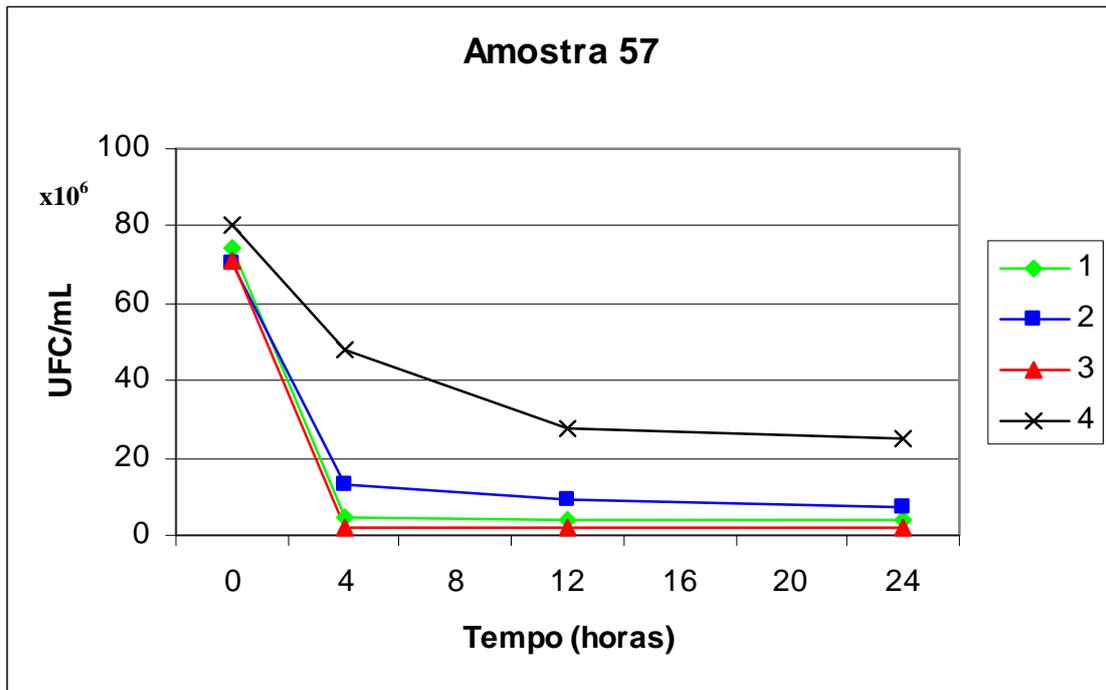


Figura 14 – Curva de sobrevivência dos isolados ambientais 57 e 61 de *C. neoformans* em relação ao tempo após exposição ao extrato vegetal de *A. macrophylla* 500 µg/mL (1), ao fluconazol 32 µg/mL (2), ao hipoclorito de sódio (3) e sem exposição a nenhum agente (controle = 4).

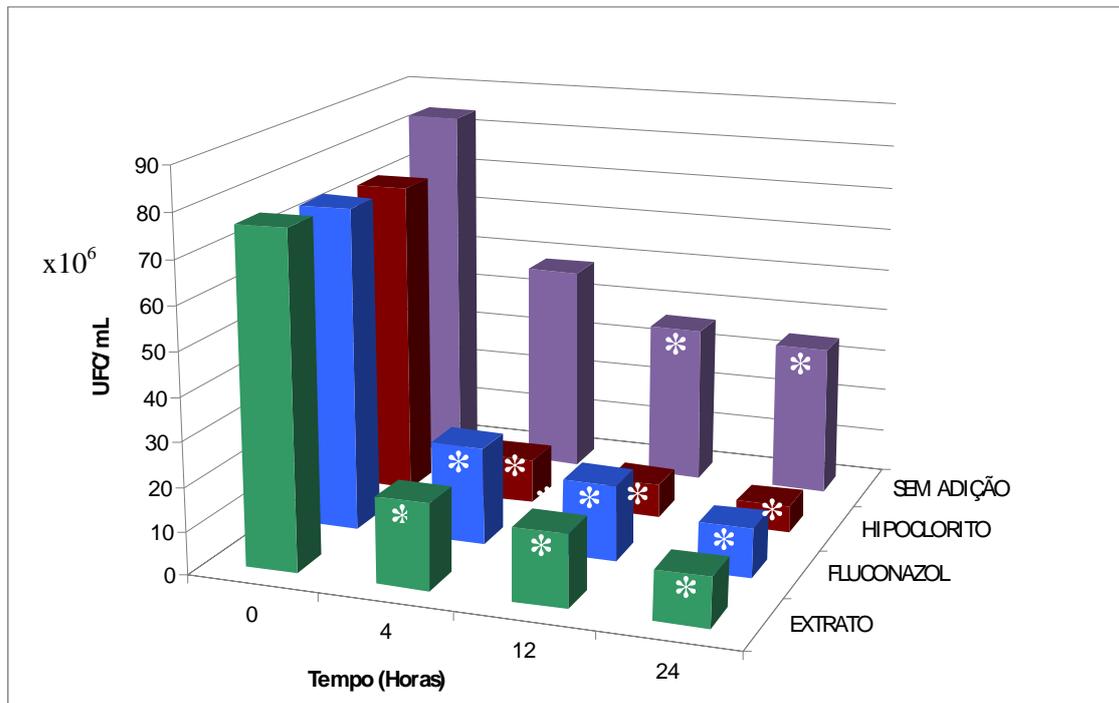


Figura 15 – Curva de sobrevivência dos isolados ambientais de *C. neoformans* estudadas em relação ao tempo após exposição ao extrato vegetal de *A. macrophylla* 500 µg/mL, ao fluconazol 32 µg/mL, ao hipoclorito de sódio e sem exposição a nenhum agente. \* – Diferenças estatisticamente significativas em relação ao tempo inicial.

Nas figuras 16 e 17 estão representados os dados de isolamento de *C. neoformans* após tratamento com as diversas substâncias, e houve diferenças significativas entre as exposições ao extrato versus fluconazol decorridas 24 horas (T24) (*Mann-Whitney*, 2-tailed,  $z=-4.669$ ,  $p\leq 0,01$ ), mas não no tempo zero (*Mann-Whitney*, 2-tailed,  $z=-0.892$ ,  $p=0.372$ ). Quando comparado os tratamentos com extrato versus hipoclorito houve diferença significativa após 24 horas (T24) (*Mann-Whitney*, 2-tailed,  $z=-2.657$ ,  $p\leq 0,01$ ) mas não no tempo inicial (T0) (*Mann-Whitney*, 2-tailed,  $z=-1.390$ ,  $p=0,190$ ). Utilizando o teste de *Kruskal Wallis* para se comparar as quatro condições de exposição nos tempos zero (T0) e após 24 horas (T24) foram obtidas diferenças significativas para os dois tempos ( $p\leq 0,01$ ) confirmando a influência da adição de substâncias na recuperação de colônias no tempo zero, mesmo partindo do mesmo inóculo. Diferenças significativas foram obtidas quando foi comparada a

exposição ao extrato, com a ausência de exposição decorridas 24 horas (*Mann-Whitney*, 2-tailed,  $z=-4.462$ ,  $p\leq 0,01$ ). Diferenças significativas podem ser observadas entre a exposição ao fluconazol (*Mann-Whitney*, 2-tailed,  $z=-4.649$ ,  $p\leq 0,01$ ) e ao hipoclorito (*Mann-Whitney*, 2-tailed,  $z=-4.669$ ,  $p\leq 0,01$ ), quando comparado com a condição de ausência de adição.

Nas Figuras 16 e 17 de maneira conjunta são apresentados os dados dos 14 isolados e das cepas padrões frente às substâncias estudadas. Comparando as diferenças entre os valores de UFC/mL obtidos após exposição ao extrato nos diferentes tempos de exposição pelo teste de *Wilcoxon* obtivemos diferenças significativas confrontando o tempo inicial (T0) com o T4 e com o T12 (*Wilcoxon*, 2-tailed,  $z=-3.408$ ,  $p\leq 0,01$ ), T0 → T24 (*Wilcoxon*, 2-tailed,  $z=-3.409$ ,  $p\leq 0,01$ ), T4 → T12 (*Wilcoxon*, 2-tailed,  $z=-2.585$ ,  $p=0,01$ ) e T12 → T24 (*Wilcoxon*, 2-tailed,  $z=-3.079$ ,  $p\leq 0,01$ ). Confrontando a média dos valores de isolamento de *C. neoformans* frente fluconazol após exposição nos diferentes tempos obtivemos significância entre o tempo inicial, quatro, doze e vinte e quatro horas (*Wilcoxon*, 2-tailed,  $z=-3.408$ ,  $p\leq 0,01$ ), também entre o tempo 4 (T4) em relação ao 12 e ao de 24 horas (*Wilcoxon*, 2-tailed,  $z=-3.409$ ,  $p\leq 0,01$ ) bem como do tempo 12 em relação ao de 24 horas (*Wilcoxon*, 2-tailed,  $z=-3.352$ ,  $p\leq 0,01$ ). Em relação ao hipoclorito, nos diferentes tempos diferença significativa foi observada confrontando o tempo zero com o de quatro, doze e vinte e quatro horas (*Wilcoxon*, 2-tailed,  $z=-3.409$ ,  $p\leq 0,01$ ), quando confrontados T4 com o T12 e o T 24 (*Wilcoxon*, 2-tailed,  $z=-3.328$  e  $z=-3,409$  respectivamente, com  $p\leq 0,01$ ) bem como entre o T12 e o T24 (*Wilcoxon*, 2-tailed,  $z=-2.906$ ,  $p\leq 0,01$ ).

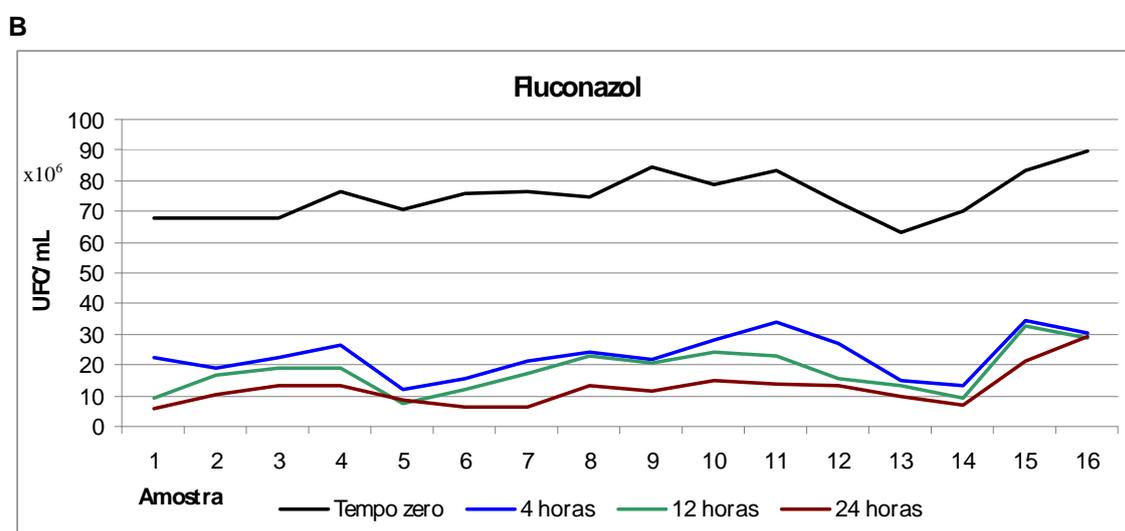
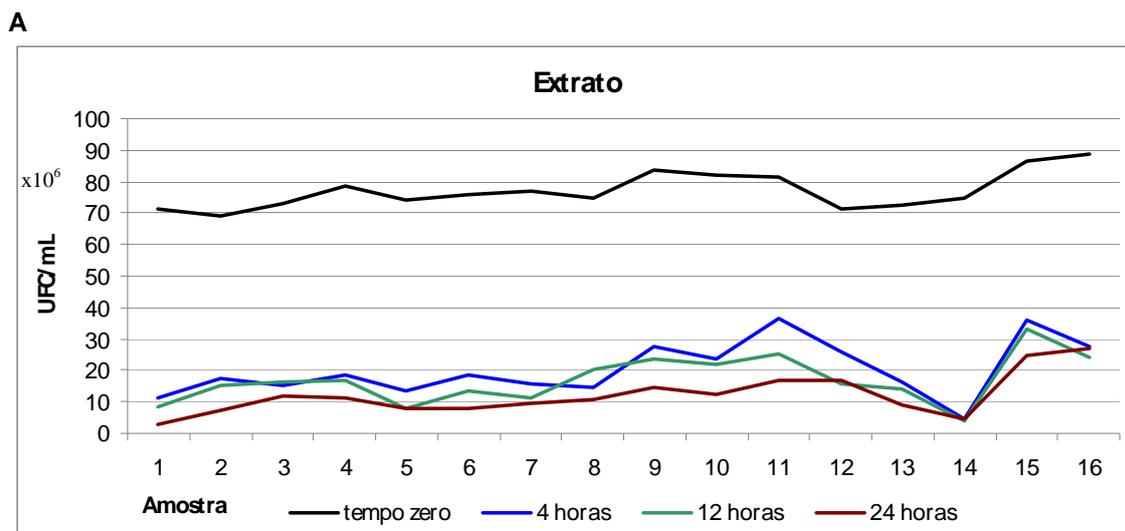


Figura 16 – Análise comparativa entre os diferentes isolados de *C. neoformans* frente ao tratamento com extrato *A. macrophylla* 500  $\mu\text{g/mL}$  (A) e de fluconazol 32  $\mu\text{g/mL}$  (B) nos tempos de T0 a T24 horas. 1= *C. neoformans* ATCC 90012, 2 ao 15: isolados de fonte ambiental selecionados (4,6,7,9, 11, 12, 23, 27, 30, 38, 39, 49, 57, 61) e 16 = *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

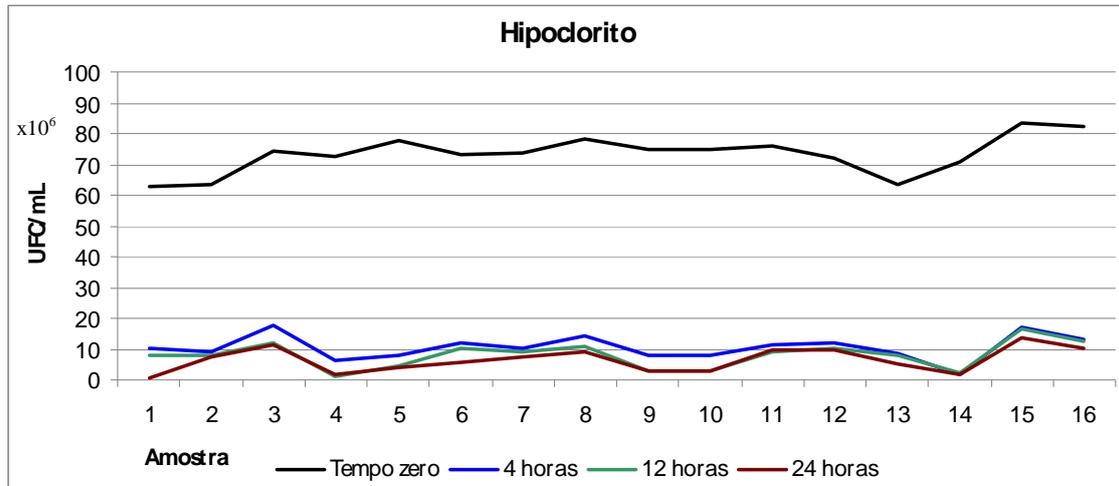
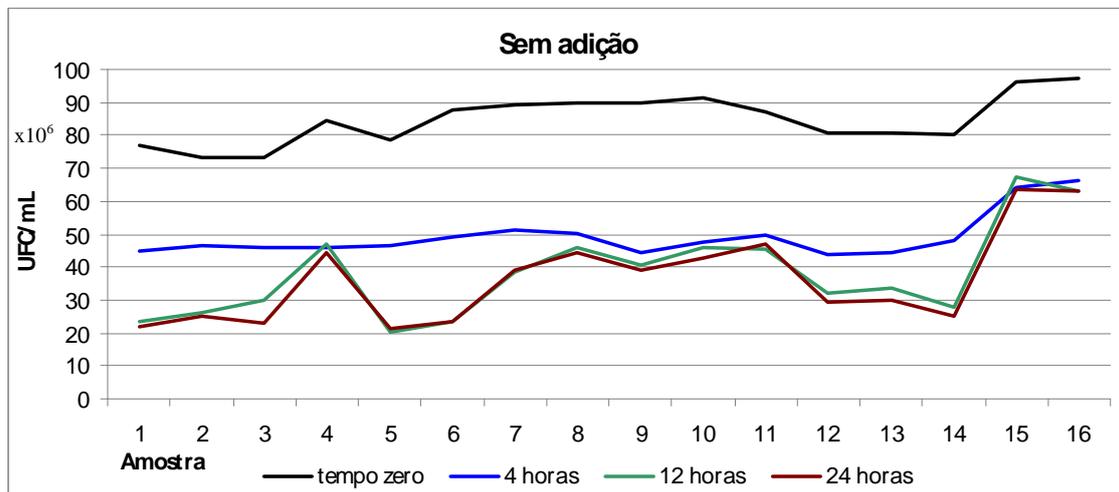
**C****D**

Figura 17 – Análise comparativa entre os diferentes isolados de *C. neoformans* frente ao tratamento com hipoclorito de sódio (**C**), e sem exposição a nenhum agente (**D**) nos tempos de T0 a T24 horas. 1= *C. neoformans* ATCC 90012, 2 ao 15: isolados de fonte ambiental selecionados (4, 6, 7, 9, 11, 12, 23, 27, 30, 38, 39, 49, 57, 61) e 16 = *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

Fazendo as mesmas comparações para a condição de ausência de adição (T0 → T4, T12, T24; T4 → T12, T24 e T12 → T24) também obtivemos resultados estatisticamente significantes (*Wilcoxon*, 2-tailed,  $z=-3.409$ ,  $z=-3,408$ ,  $z=-3408$ ,  $z=-3,182$ ,  $z=-3,409$ ,  $z=-2,670$ ; com valor de  $p \leq 0,01$ , respectivamente). Provavelmente as diferenças encontradas refletem a variação no número de colônias isoladas de cada cepa nos tempos de exposição, que influenciam na obtenção da média dos valores. Tal variação se faz visível quando observamos a curva em cada condição de exposição, e é bem perceptível na curva que representa a condição de ausência de adição evidenciando uma flutuação muito maior, em especial após 12 e 24 horas de exposição.

Nas Figuras 18 e 19 estão representados os dados de isolamento por tempo. Por estas figuras fica evidente a diminuição nos números de UFC/mL recuperadas em todas as amostras à medida que o tempo passa, diferenciando as condições de exposição. Estas figuras também evidenciam como é acentuada a queda da recuperação do número de UFC/mL isoladas na condição de exposição às substâncias avaliadas, com ênfase para o hipoclorito, seguido do extrato e do fluconazol. Fica evidenciada por estas figuras a influência da adição de substâncias na recuperação das leveduras na condição de tempo zero. Decorridas as quatro horas de exposição ao extrato, obtivemos número de isolamentos que corresponde a menos da metade do número de colônias isoladas nas condições de ausência de adição de substâncias em 11 das 16 amostras testadas. Após 12 horas de exposição ao extrato este número sobe para 13 das 16 cepas estudadas, e no último ponto da cinética de exposição (T24) isto ocorre nas 16 amostras estudadas.

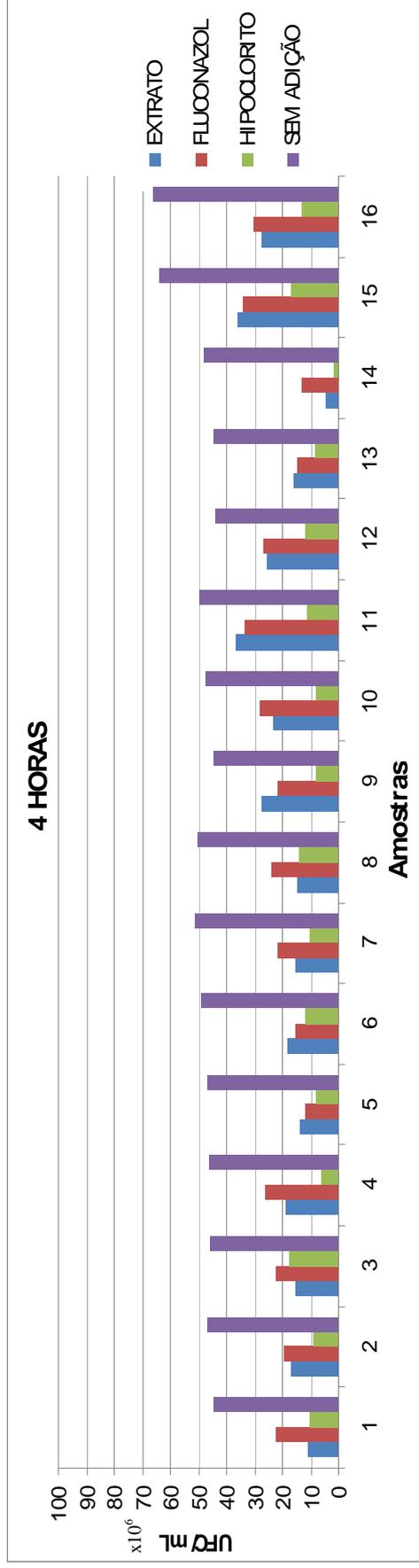
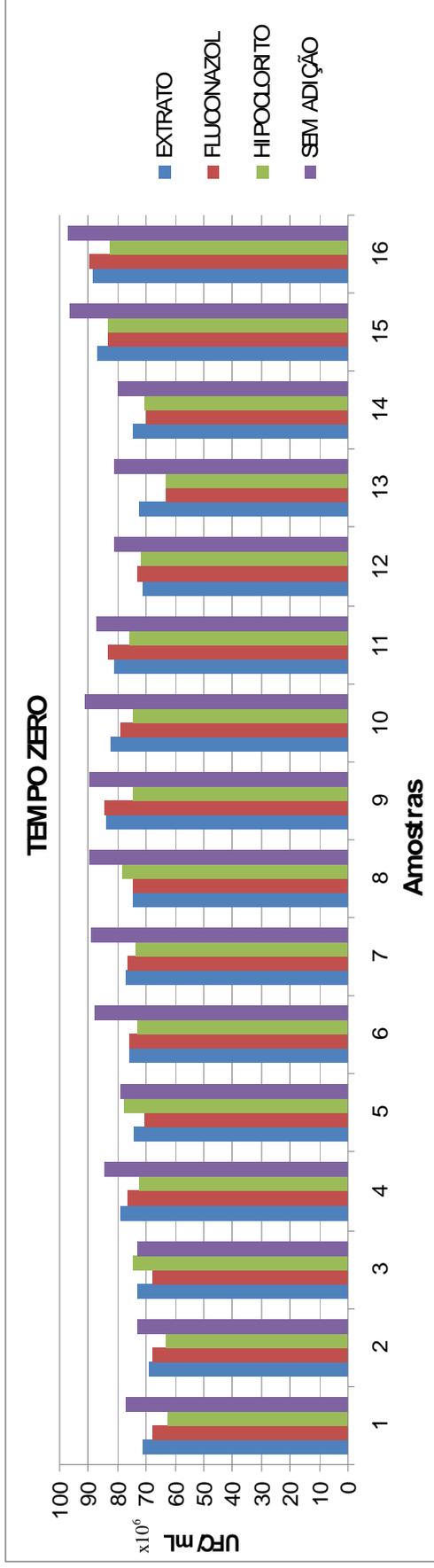


Figura 18 – Variação do número de colônias dos isolados estudados (1 = ATCC 90012, 2 ao 15 = isolados ambientais selecionados (4,6,7,9, 11, 12, 23, 27, 30, 38, 39, 49, 57, 61) e 16 = ATCC 22019) com exposição a diferente agentes no tempo inicial (A), e decorrida quatro horas de exposição (B).

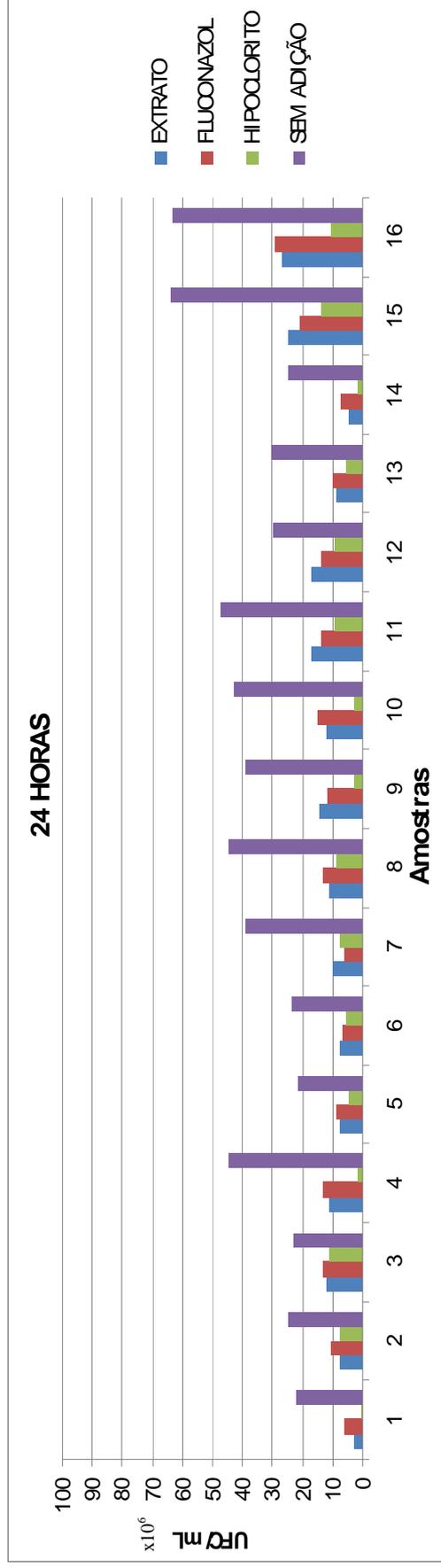
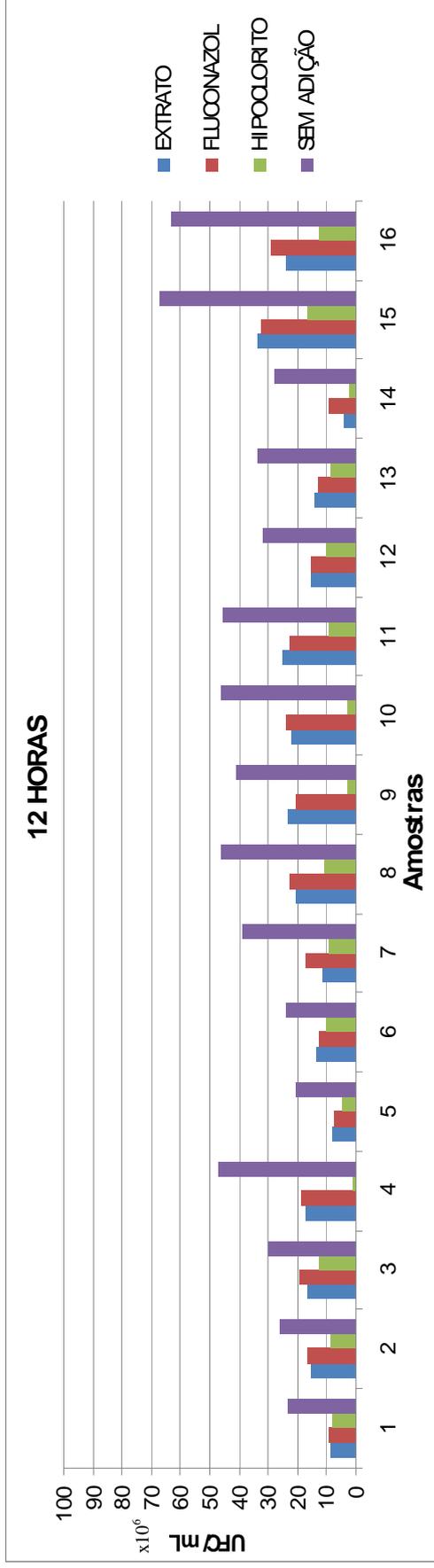


Figura 19 – Variação do número de colônias dos isolados estudados (1 = ATCC 90012, 2 ao 15 = isolados ambientais selecionados (4,6,7,9, 11, 12, 23, 27, 30, 38, 39, 49, 57, 61) e 16 = ATCC 22019) com exposição a diferente agentes decorrida 12 horas (C), e 24 horas de exposição (D).

## ESTABILIDADE DO EXTRATO:

Outro aspecto abordado neste estudo foi a verificação da estabilidade do extrato da *A. macrophylla* frente a alguns fatores comuns como variações nas condições físicas como frente à incidência direta de luz, a variações de temperatura e pH e o tampão utilizado para testar o extrato em pH alcalino. Os dados indicam que não houve alteração dos parâmetros analisados quando comparados aos dados obtidos sem a incidência de tais fatores, não ocorrendo alteração nos resultados. Os dados obtidos após exposição estão apresentados no quadro 4.

Quadro 5 – Dados e resultados da avaliação da atividade do extrato frente à cepa de *Cryptococcus neoformans* ATCC 90012 após incidência de luz, aumento de temperatura e a variação de pH, ao tampão utilizado no teste com pH Alcalino (Tris) e ainda da mesma cepa ATCC frente ao extrato e aos antifúngicos fluconazol e anfotericina B. Valores de CIM e CFM expressos em µg/mL.

	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)
Luz	125	125
Calor	125	125
pH básico	250	250
pH ácido	125	>250
Tris	125	>250
Extrato	125	>250
Fluconazol	4	16
Anfotericina B	0,5	0,5

Base = extrato solubilizado com tampão Tris pH 8,0

Acido = extrato solubilizado com tampão Acetato pH 4,0

## DISCUSSÃO:

*Cryptococcus neoformans* é cosmopolita, ocorre em diversos substratos orgânicos, freqüentemente associa-se a habitat de aves, excretas secas, ricas em fontes de nitrogênio, como uréia e creatinina. Condições favoráveis ao crescimento abundante desta levedura formam microfocos, notadamente em centros urbanos e relacionados a pombos. É agente causador de uma micose, a criptococose, que acomete principalmente indivíduos imunocompetentes, mas também imunocomprometidos.

Esta importante doença fúngica é de grande interesse principalmente por estar associada a pacientes imunocomprometidos, especialmente os portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). Segundo o boletim, HIV/Aids das Nações Unidas e Organização Mundial da Saúde (<http://www.unaids.org/en/>), mais de 40 milhões de pessoas no mundo estão infectadas pelo vírus HIV e com aproximadamente três milhões de mortes anualmente. A meningite criptocócica é a infecção fúngica mais comum do sistema nervoso central e a terceira complicação neurológica mais freqüente entre os pacientes com a síndrome (DEL VALLE E PINA-OVIEDO, 2006; FERNANDES et al, 2008). A doença é mais freqüente em adultos, mas apesar de relativamente rara, pode afetar crianças, sem qualquer doença de base (PAPPALARDO e MELHEM, 2003).

Existem atualmente duas espécies consideradas patogênicas para o homem: *C. neoformans* e *C. gattii*. Este estudo o conhecimento sobre a dinâmica populacional de 67 isolados ambientais da região de Araraquara. Por meio de técnicas clássicas de identificação, nenhuma das 67 amostras foi identificada como *C. gattii*, resultado que também obtivemos pela classificação através de técnicas moleculares, revelando 100% de concordância entre os resultados obtidos pelas diferentes metodologias.

Tradicionalmente, a identificação das espécies *C. neoformans* e *C. gattii* pode ser realizada em meio de canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) em que só a espécie *C. gattii* é resistente a canavanina e é capaz de utilizar a glicina como única fonte de carbono e nitrogênio, levando a alcalinização do meio e sua mudança de cor, característica usada como identidade desta ES espécie. Resultados CGB falsos positivos (ou negativos) tem levado os pesquisadores a buscar métodos mais específicos para identificação dos isolados. As técnicas baseadas na PCR são

uma ótima alternativa, mostrando-se mais sensíveis, específicas e rápidas e sofrendo menos influência de fatores externos do que os métodos tradicionais baseados em aspectos fenotípicos (MATSUMOTO et al, 2008; LEAL, 2008). Matsumoto et al, 2008 verificaram 100% de concordância entre os métodos clássicos e moleculares, ao contrário de Leal et al., (2008) que encontraram discordância em seis (4,55%) de 132 isolados analisados, apresentando os métodos moleculares maior especificidade para identificação.

No Brasil, fontes ambientais de *C. neoformans* foram progressivamente identificadas e os isolados foram obtidos em São Paulo, Rio de Janeiro, Piauí, Roraima e Amazonas (FILIÚ et al., 2002; LAZERA et al., 1998 e 2000). *Cryptococcus gattii* é isolado principalmente de regiões tropicais e subtropicais, mas áreas de clima temperado e frio devem ser incluídas em sua distribuição (FRANZOT et al., 1999). Seu habitat foi primeiramente relacionado a árvores (*Eucalyptus camaldulensis*), na Austrália, mas, recentemente foi isolado de várias outras espécies de árvores, em diversos países da América Latina, África, Ásia e América do Norte (ELLIS e PFEIFFER, 1990; NISHIKAWA et al., 2003) Atualmente, várias são as hipóteses sobre o nicho primário deste gênero de levedura, porém relatos de isolamento de *C. neoformans* de diversos tipos árvores e madeiras em decomposição, associados ou não as fezes de pássaros levantaram a questão sobre a possibilidade destas fontes serem o possível nicho ecológico primário para a levedura (LAZERA et al., 1993, 1996, 1998 e 2000; RANDHAWA et al., 2001; ESCANDON et al., 2002; REIMÃO et al., 2007).

Após a identificação pelas técnicas clássicas, utilizamos a técnica molecular de PCR-*mating type* para verificarmos o tipo sexual e realizamos a tipagem molecular das 67 cepas ambientais através da técnica PCR RFLP do gene URA5. A tipagem dos 67 isolados pela técnica do PCR RFLP do gene URA5 classificou-os como pertencentes ao tipo VNI, predominância esta amplamente relatada na literatura (CASALI et al., 2003; MEYER et al., 2003; ESCANDON et al. 2006). A homogeneidade dos resultados obtidos pode indicar que as amostras provem de uma mesma fonte. A análise epidemiológica dos *mating type* determinadas pela PCR, revelou prevalência de 100% de MAT $\alpha$ , dado semelhante ao encontrado na literatura mundial e nacional (BOEKHOUT et al., 2001; CASALI et al., 2003; MEYER et al., 2003; TRILLES et al., 2003; ABEGG et al., 2006; ALMEIDA et al, 2007; LIN et al, 2008; MATSUMOTO et al, 2008).

*Cryptococcus* apresenta-se na fase anamórfica (forma leveduriforme) quando em vida parasitária ou ambiental e na fase teleomórfica (forma filamentosa), em determinadas condições ambientais, passando a ser chamado *Filobasidiella neoformans* (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992) No estágio sexual de *Filobasidiella* células de *mating type* opostos e complementares ( $\alpha$  e *a*) se fundem para formação de hifas dicarióticas e basídios com quatro cadeias de basidiósporos (KWON-CHUNG, 1975). Apesar dos basidiósporos serem produzidos, na proporção de um  $\alpha$ , para um *a*, o que se observa, tanto em isolados ambientais, quanto em isolados clínicos, é uma predominância quase absoluta do tipo  $\alpha$ , em torno de 98-99,9% (LIN et al., 2009; LIN e HEITMAN, 2008; XU et al., 2000; McCLELLAND et al., 2004).

Em estudo recente feito em nosso laboratório, MATSUMOTO et al., (2007) estudaram 47 isolados clínicos de *C. neoformans* de várias regiões do Estado de São Paulo e a maioria foi classificada como pertencendo ao tipo molecular VNI (45/47) e apenas dois foram VNII quando analisados por PCR-*fingerprinting* e PCR-RFLP. Por outro lado, isolados de *C. neoformans* do Estado de São Paulo foram investigados pela técnica de cariótipo e RAPD, encontrando-se considerável homogeneidade entre os tipos moleculares (ALMEIDA et al., 2001; REZENDE, 2002; VIVALDINI, 2003).

A meningoencefalite criptocócica é a forma clínica mais comum e a mais importante da doença, apresentando alto índice de letalidade, se tratada tardiamente (CASADEVALL e PERFECT, 1998; CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008). O tratamento de pacientes HIV+ com a terapia antiretroviral, tem provocado queda no índice de incidência de criptococose, no entanto, a doença pode manifestar-se mesmo durante este tratamento e o prognóstico continua a ser desfavorável (SLOAN et al., 2009; DROMER et al., 2004; FRIEDMAN et al., 2005). O tratamento de escolha para esta infecção consiste na terapia primária com anfotericina B seguida de manutenção com fluconazol por tempos prolongados (PAPPALARDO e MELHEM, 2003). Entretanto, a taxa de letalidade continua consideravelmente alta, em torno de 9,4% (VAN DER HOST et al., 1997).

Por outro lado, taxas altas de persistência e freqüentes recidivas da doença têm causado uma preocupação crescente entre os clínicos a respeito do potencial para o surgimento de cepas resistentes aos antifúngicos (SLOAN et al., 2009; LONGLEY et al. 2008; BRANDT et al., 1996). Por estes motivos, em nosso trabalho, avaliamos os perfis de sensibilidade de 67 isolados ambientais aos antifúngicos

fluconazol, cetoconazol, itraconazol e anfotericina B por meio da técnica de disco difusão em ágar padronizada pelo CLSI através da portaria M44-A (2004). Por esta técnica não encontramos nenhum isolado com sensibilidade diminuída a anfotericina B, ao cetoconazol ou ao itraconazol. Por outro lado, dois isolados (3%) apresentaram valores de sensibilidade diminuída para fluconazol. Para este antifúngico, o valor do tamanho dos halos de inibição apresentou MODA de 19 mm e Desvio Padrão de 4,3 mm para mais ou para menos, sobre a média de 23,3 mm evidenciando um intervalo de flutuação (19 mm – 27,6 mm) dentro da faixa considerada sensível ou intermediário, de acordo com dados do fabricante (CECON). Pela técnica de microdiluição padronizada pelo CLSI através da portaria M27-A2 (2002), observamos CIMs variáveis para fluconazol, e 14 das 67 amostras (21%) apresentaram CIM de 16 µg/mL, concentração esta que, segundo Aller et al., (2000) é preditiva de falência terapêutica e consideramos como elevadas para amostras provenientes de fontes ambientais. Silva et. al., (2008) analisaram os perfis de susceptibilidade de cepas clínicas *C. neoformans* e *C. gattii* (M27-A2) frente ao fluconazol, itraconazol, Anfotericina B e cetoconazol. Neste estudo, *C. neoformans* apresentou CIM de 8 µg/mL, e uma amostra de *C. gattii* apresentou valor de CIM 16 µg/mL. Duas amostras foram resistentes para Itraconazol e 2 para Anfotericina B e apesar de nenhum isolado possuir sensibilidade diminuída ao fluconazol os autores consideraram elevado a CIM apresentada pelo isolado *C. gattii*.

Kobayashi et al. (2005) testaram a sensibilidade a anfotericina B, itraconazol e fluconazol em 36 isolados ambientais de *C. neoformans* e não encontraram nenhuma cepa resistente. Souza et al. (2005), da mesma forma, não encontraram resistência entre os 110 isolados testados (70 clínicos e 40 ambientais) com anfotericina B, itraconazol, fluconazol e ravuconazol, entretanto, foram observadas CIMs maiores entre os isolados clínicos comparado aos ambientais. Em contrapartida, Drumond et al. (2007), em estudo de susceptibilidade de *C. neoformans* frente a agentes antifúngicos relataram valores de CIM 50 para fluconazol mais elevados em isolados ambientais (64 µg/mL) do que os provenientes de isolados clínicos (16 µg/mL). A falta de consenso se deve, dentre outras coisas, a faixa de referência dos níveis de sensibilidade e CIM preconizados pelo CLSI para fluconazol serem relativamente elevados, e se devem ao fato de que os testes de sensibilidade aos antifúngicos não foram padronizados utilizando este gênero de

levedura, e sim o gênero *Candida*. Dados de nosso estudo chamam a atenção para necessidade da realização de testes com isolados de diferentes etiologias, clínicas ou ambientais, para fomentar pesquisas com dados necessários à consolidação de opinião que corrija esta distorção, especialmente para fluconazol, que ainda constitui a única alternativa para tratamento de manutenção da criptococose que afeta o sistema nervoso central, em nosso país. Em nosso trabalho não foi observado o crescimento residual denominado “*trailing*”, que se apresenta como uma turbidez na placa de microtitulação, ou de “fino” crescimento dentro de halos de inibição especialmente frente ao Fluconazol, e que quando observado, pode induzir a leituras de CIMs falsamente elevados. Em nosso estudo o teste estatístico de Spearman revela um índice de correlação ideal entre as técnicas de microdiluição e disco difusão.

Atualmente, foi descrito um grande aumento de casos de resistência aos medicamentos por vários fungos patogênicos para o homem (HOF, 2008). O reduzido número classes de antifúngicos disponíveis tem estimulado investigação de novas substâncias antifúngicas provenientes de fontes ainda pouco exploradas tais como plantas, como uma alternativa que possibilite o combate a estes patógenos humanos. A crise econômica, o elevado custo dos medicamentos industrializados, o ineficiente acesso público aos cuidados médicos e farmacêuticos, além dos efeitos colaterais causados pelas drogas sintéticas são alguns dos aspectos que contribuem para o uso das plantas medicinais no cuidado a saúde (ROJAS et al., 2006; HOLETZ et al., 2002; ABAD et al., 2007). Em nosso estudo avaliamos para atividade antifúngica específica contra *C. neoformans* e o extrato hexânico de *A. macrophylla* apresentou CIM que variou entre 15,6 e >250 µg/mL e etanólico de *Machaerium villosum* CIM que variou entre 1,95 e 125 µg/mL.

As plantas são usadas na medicina desde longa data, sendo extensivamente empregadas na medicina popular por representarem uma alternativa econômica, de fácil obtenção e aplicabilidade para diversas patologias (ROJAS et al., 2006). Extratos de plantas, ou seus componentes são uma valiosa fonte de novos agentes medicinais (CARVALHO e FERREIRA, 2001; KAYSER e KIDERLEN, 2001). Apesar da grande biodiversidade do Cerrado e Mata Atlântica no Brasil, o potencial de espécies vegetais como fontes de novos medicamentos ainda é pouco explorada. Menos de 20% de todas as espécies vegetais a partir deste ambiente foram estudados para a presença de substâncias biologicamente ativas. Nos últimos anos,

as propriedades antimicrobianas de plantas foram cada vez mais notificadas em diferentes partes do mundo. Assim, este estudo abre a possibilidade para que o emprego de alguns destes extratos sejam utilizados direta ou indiretamente como uma alternativa de combate à criptococose. Novos estudos fazem-se necessários à identificação dos prováveis alvos na célula fúngica.

A exposição aos esporos ou células com pouca cápsula de *C. neoformans* leva a um quadro de infecção que pode ser assintomático e rapidamente curado ou permanecer latente no pulmão por longo período de tempo na forma de granuloma. Em pacientes imunocomprometidos, o fungo pode disseminar dos pulmões para outros órgãos, atingindo principalmente, o sistema nervoso central causando a meningoencefalite, que contribuem para alto quadro de letalidade destes pacientes (JARVIS et al., 2009). Por outro lado, a forma pulmonar é pouco descrita e esta fase pode ser pouco percebida e mesmo não diagnosticada, porém pacientes que nunca apresentaram sintomas de doença apresentam antígenoemia positiva, que evidencia que o contato direto com esta levedura ocorre constantemente (SLOAN et al., 2009; IDNURM et al., 2005).

No Brasil, a população de pessoas HIV<sup>+</sup> é grande (>300.000), entretanto, os dados epidemiológicos sobre a criptococose e seu agente etiológico, associada a este grupo de pessoas, ainda são insuficientes (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008). A exposição a fontes ambientais deste grupo de pessoas com quadro de imunocomprometimento aumenta consideravelmente a possibilidade da aquisição de criptococose. Com base nestes problemas, após obtenção dos dados de tipagem molecular e de susceptibilidade das cepas ambientais, tivemos como enfoque a obtenção de uma substância com atividade antifúngica capaz de diminuir o número de células infectantes de *C. neoformans* em seu nicho, minimizando assim a possibilidade de contaminação humana, especialmente por indivíduos com sistema imunológico comprometido.

Silva et al., (2007) relataram que os ésteres e iridóides isolados da espécie *Alibertia macrophylla* possuem atividade antifúngica, o que possibilita e direciona o estudo de sua utilização seja na clínica, ou como saneante ambiental. Em nosso trabalho avaliamos a atividade (perfil de sensibilidade) do extrato *Alibertia macrophylla* em 14 das 67 cepas ambientais, e que apresentaram CIM de 16 µg/mL para fluconazol (M27-A2), através da realização de uma cinética de exposição em 24 horas, obtendo curvas de sobrevivência segundo Klepser et al (1998), Ernst et

al. (2002), Lewis et al. (2002) e Rodero et al. (2000) com modificações. Um valor adequado de inóculo é um fator fundamental na interpretação dos resultados dos testes de sensibilidade. Segundo Klepser et al. (1998), inóculos elevados podem influenciar na persistência da levedura. Em nosso estudo utilizamos um inóculo correspondente ao possível número de leveduras encontradas no ambiente ( $10^7$ ), que é maior que os preconizados para realização desta técnica, porém, por propormos a utilização do extrato com um saneante, necessitávamos conhecer os resultados da eliminação desta levedura em situação de semelhança com seu nicho primário.

Resultados importantes foram obtidos após 24 horas de exposição ao extrato na concentração de 500 µg/mL evidenciaram eficiência significativa  $p =$  variando de 95,8 a 71,1% ( $p=0,001$ ), sendo que índice de 85% ou mais foi observado na maioria dos isolados avaliados (14/15), enquanto que somente 10/15 apresentaram eficiência com a droga antifúngica fluconazol nas mesmas condições de ensaio. Em ambas as exposições houve redução no número de UFC recuperadas, sendo este importante fator para utilização deste extrato como saneante ambiental. Após 24 horas de exposição ao extrato, o número de UFC recuperadas de todas as cepas testadas foi significativamente inferior ( $p=0,000$ ) quando comparadas ao tempo inicial. Apenas em três isolados ambientais (38, 39 e 61), o índice de eficiência foi inferior a 80%. Confrontando estes dados com o uso de hipoclorito verifica-se que o índice de eficiência variou de 98,8 a 83,5%, e que o menor índice ocorreu também com o isolado 61, que apresentou índice de 71,1% com o extrato. A curva obtida pela omissão da adição de extrato também declinou, provavelmente pela ausência de nutrientes, porém, em todos os pontos da cinética obtivemos um número maior de UFC recuperadas do que com as cepas expostas às outras substâncias (extrato, antifúngico e hipoclorito). A mesma observação ocorre quando da comparação da curva obtida pela exposição ao extrato com a curva controle de sobrevivência, confirmando sua atividade na eliminação desta levedura.

Quando da utilização de extratos com atividade antifúngica para obtenção de efeito saneante contra *C. neoformans*, fatores como a concentração, solubilidade, estabilidade, podem ser fatores-chaves para obtenção de resultados favoráveis na eliminação desta levedura em seu habitat. O extrato de *Alibertia macrophylla* por nós estudado apresentou relativa estabilidade após teste de algumas variáveis. Levando em consideração a atividade antifúngica como um fator fundamental,

estes resultados evidenciam a atividade do extrato por nós testado e abre possibilidades para que sua utilização como saneante de uso doméstico seja viabilizada. Estudos biotecnológicos de outras variáveis e com maior número de isolados de origem diversificada se farão necessários para confirmar estes achados. Com isso, os resultados encontrados, fornecem além de dados epidemiológicos, moleculares e de susceptibilidade dos isolados ambientais desta levedura, também, seu comportamento frente ao extrato de *A. macrophylla* com grande valia para obtenção de saneantes naturais. Nossos dados poderão orientar a pesquisa biotecnológica de outras características necessárias à viabilização da formulação de um saneante bem como servirão de fomento bibliográfico para investigação de novos compostos com atividades antifúngicas e sua forma de utilização no combate a tão importante micose.

**CONCLUSÕES:**

1. A determinação do *mating type* pela PCR classificou todos os isolados ambientais de *C. neoformans* em *mating type*  $\alpha$  (alfa).
2. Todos os isolados foram classificados por PCR-RFLP URA5 no tipo molecular VNI – sorotipo A
3. Pelo método de microdiluição (M27A2 – CLSI – 2002), 21% (14/67) dos isolados ambientais apresentaram sensibilidade diminuída ao fluconazol com CIM de 16  $\mu\text{g/mL}$  e mais de 50% (34/67) apresentaram CIM de 8  $\mu\text{g/mL}$ .
4. Encontramos índice de correlação ideal entre a técnica de microdiluição (M27A2 CLSI) e a de disco difusão (M44-A CLSI) (*Spearman*, 2-tailed,  $p=1$ )
5. Houve ampla variação da CIM entre os isolados avaliados frente aos extratos de *Alibertia macrophylla* (CIM 15,6 e  $>250 \mu\text{g/mL}$ ) e *Machaerium villosum* (CIM 1,95 e 125  $\mu\text{g/mL}$ )
6. O extrato de *Alibertia macrophylla* apresentou efeito saneante com índice de eficiência de mais de 80% após 24 horas, na grande maioria dos isolados de *C. neoformans*, mesmo utilizando inoculo de  $10^7$  UFC/mL.
7. O extrato de *Alibertia macrophylla* é estável à incidência de luz, ao calor e variação de pH.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEGG, M.A.; CELLA, F.L.; FAGANELLO, J.; VALENTE, P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN M.H. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. *Mycopathologia*, v. 161, p. 83-91, 2006.

AJELLO, L. Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in soils. *Am. J. Hyg.*, v. 67, p. 72-77, 1958.

AJELLO, L., HOSTY, T.S., PALMER, J. Bat histoplasmosis in Alabama. *Tropical Medicine and Hygiene*. v.16, p. 329-331, 1967

ALLER, A. I., MARTIN-MAZUELOS, E., LOZANO, F., GOMEZ-MATEOS, J., STEELE-MOORE, L., HOLLOWAY, W. J., GUTIÉRREZ, M. J., RECIO, F. J., and ESPINEL-INGROFF, A. Correlation of Fluconazole MICs with Clinical Outcome in Cryptococcal Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. V. 44, p. 1544-1548, 2000.

ALLER, A. I., MARTIN-MAZUELOS, E., GUTIÉRREZ, M.J.; BERNAL, S.; CHÁVEZ, M.; RECIO, F.J. Comparison of the Etest and microdilution method for antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* to four antifungal agents. *J Antimicrob Chemother*. v.46, n.6, p.997-1000, 2000.

ALMEIDA, A.M.F. - Análise do cariótipo eletroforético de diferentes amostras de *Cryptococcus neoformans* e correlação com suscetibilidade a drogas antifúngicas. Araraquara, 2000. (Dissertação de Mestrado - Instituto de Química da Universidade Estadual de São Paulo).

ALMEIDA, A.M.F.; MATSUMOTO, M.T.; BAEZA, L.C.; DE OLIVEIRA E SILVA, R.B.; KLEINER, A.A.P.; MELHEM, M.S.C.; MENDES GIANNINI, M.J.S. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical sequential isolates of *Cryptococcus neoformans* from Sao Paulo State, Brazil. *FEMS Yeast Res.*, 2007

ANDRADE, G.A. Comparação entre isolados ambientais e clínicos e *Cryptococcus neoformans* do Estado de São Paulo quanto aos aspectos genotípicos e de patogenicidade. 2003. 97f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2003.

AVERBUCH, D., BOEKHOUT, T.; FALK, R.; ENGELHARD, D, SHAPIRO, M.; BLOCK, C.; POLACHEK, I. Fungemia in a cancer patient caused by fluconazole-resistant *C. neoformans*. *Med. Mycol.* v.40, p.479-484, 2002.

BARBIERI, M. S. C. Meningite criptocócica em indivíduos HIV na Região de Araraquara. Araraquara, 2001. (Monografia do curso de Especialização em Saúde Pública - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista).

BARÓ, T.; TORRES-RODRIGUES, J.M.; MORERA, YOLANDA.; ALIA, CONCEPCION.; LOPEZ, OLGA.; MENDEZ, RAUL. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* isolades from clinical and environmental sources in Spain. *J. Clin. Microb.* v.37, p.1170-1172,1999.

BARONI, F. A . Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos localizadas em torres de igrejas na cidade do Rio de Janeiro: Fatores de Virulência e Sensibilidade aos Antifúngicos. (Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2001).

BARONI, F.D.E.A.; PAULA, C.R.; SILVA, E.G.; VIANI, F.C.; RIVERA, I.N.; OLIVEIRA, M.T.; GAMBALE, W. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro City, RJ, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, v. 482, p. 71-75, 2006.

BARQUIST, E.; FEIN, E.; SHADICK, D.; JOHNSON, J.; CLARK, J.; SHATZ, D.A. Randomized prospective trial of amphotericin B lipid emulsion versus dextrose colloidal solution in critically ill patients. *J. Trauma.*, v. 47, p. 336-340, 1999.

BARRETO de OLIVEIRA, M.T.; BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; HAGEN, F.; BARONI, F.A.; LAZERA, M.S.; LENGELER, K.B.; HEITMAN, J.; RIVERA, I.N.; PAULA, C.R. *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, v. 42, p. 1356- 1359, 2004.

BASSO, L. A.; SILVA L. H. P.; FETT-NETO A. G.; JUNIOR W. F. A.; MOREIRA I. S.; PALMA M. S.; CALIXTO J. B.; FILHO S. A.; SANTOS R. R.; SOARES M. B. P.; SANTOS, D. S. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, vol. 100, Rio de Janeiro, 2005.

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

BAWENS, L.; SWUINNE, D.; DEVROEY, C.; MEURICHY, D. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in the aviaries of the Antwerp Zoological Gardens. *Mykosen.*, v. 29, p. 292-294, 1986.

BENNETT, J. E.; KWON-CHUNG, K. J.; THEODORE, T. S. Biochemical differences between serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *Sabouraudia*, v. 16, p. 167-174, 1978.

BENNETT, J.E.; DISMUKES, W.E.; DUMA, R.J.; MEDOFF, G.; SANDE, M.A.; GALLIS, H.; LEONARD, J.; FIELDS, B.T.; BRADSHAW, M.; HAYWOOD, H.; MCGEE, Z.A.; CATE, T.R.; COBS, C.G.; WARNER, J.F.; ALLING, D.W. A Comparison of amphotericin B alone and combined with flucytosine in the treatment of cryptococcal meningitis. *N. Engl. J. Med.*, v. 301, p. 126-131, 1979.

BENNETT, J.E.; KWON-CHUNG, K.J.; HOWARD, D. Epidemiologic differences among serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *Am. J. Epidemiol.* v.105, p.582-586,1984.

BEZERRA, C. C. F.; WANKE, B.; CAVALCANTI, M. A. S.; TRILLES, L.; MACEDO, R. L.; NISHIKAWA, M. M.; LAZERA, M. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* e *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* isolados de Eucalyptus camaldulensis no Brasil. In: Congresso Brasileiro de Micologia, 2, Rio de Janeiro, 17 a 21 de abril de 1998. *Temas Livres*, p. 183 (Resumo G 45).

BHARTTACHARJEE, A.K.; BENNETT, J.E.; GLAUDEMANS, C. P. J. Capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans*. *Rev. Infect. Dis.*, v. 6, p. 619-64, 1984.

BOEKHOUT, T. The 5th Conference on *Cryptococcus* and cryptococcosis, Adelaide, 2002.

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

BOEKHOUT, T., VAN BELKUM, A. Variability of karyotypes and RAPD types in genetically related strains of *Cryptococcus neoformans*. *Curr. Genet.*, v. 32, p. 203-208, 1997.

BOEKHOUT, T.; SCORZETTI, G. Differential killer toxin sensitivity patterns of varieties of *Cryptococcus neoformans*. *J. Med. Vet.* v. 35, p. 147-149, 1997.

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

BOGAERTS, J.; ROUVROY, D.; Taelman, H.; KAGAME, A.; AZIZ, M. A.; SWINNE, D.; VERHAEGEN, J. Aids – associated cryptococcal Meningitis in Rwanda (1983-1992): epidemiologic and diagnostic features *J. Infect.* v.39, p. 32-37, 1999.

BOTREL, M.C.G.; CARVALHO, D. Variabilidade isoenzimática em populações naturais de jacarandá paulista (*Machaerium villosum* Vog).. *Revista Brasileira de Botânica*, Sao Paulo, v. 27, p. 621-628, 2004.

BOVERS, M.; DIAZ, M.R.; HAGEN, F.; SPANJAARD, L.; DUIM, B.; VISSER C.E.; HOOGVELD, H.L.; SCHARRINGA, J.; HOEPELMAN, I. M.; FELL. J.W.; BOEKHOUT, T. Identification of Genotypically Diverse *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Isolates by Luminex xMAP Technology *J. Clin. Microbiol.*, v.45, n.6, p. 1874-1883, 2007.

BRAGA, F.G.; BOUZADA, M.L.; FABRI, R.L.; de O MATOS, M.; MOREIRA, F. O.; SCIO, E.; COIMBRA, E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *J. Ethnopharmacol.* v.111, p.396-402, Juiz de Fora, MG, 2007.

BRANDT, M.E.; HUTWAGENER, L.C.; KLUG, L.A.; BAUGHMAN, W.S.; RIMLAND, D.; GRAVISS, E.D.; HAMILL, R.J.; THOMAS, C.; PAPPAS, P.G.; REINGOLD, A.L.; PINNER, R.W. Molecular subtype distribution of *Cryptococcus neoformans* in four areas of the United States. *J. Clin. Microb.*, v. 34, p. 912-917, 1996.

BRANDT, M.E.; HUTWAGNER, L.C.; KUYKENDALL, R.J.; PINNER, W.S. Comparasion of multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analysis for molecular subtyping of *Cryptococcus neoformans* . *J. Clin. Microbiol.* v.33, p.1890-1895, 1995.

BRANDT, M. E., PFALLER, M. A., HAJJEH, R. J. H., PAPPAS, P. G., REINGOLD, A.L., RINLAND, D., and WARNOCK, D. W., for THE CRYPTOCOCCAL DISEASE ACTIVE SURVEILANCE GROUP. Trends in Antifungal Drug Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* Isolates in the United States: 1992 to 1994 and 1996 to 1998. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* V. 45, p.3065-3069, 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. 2005. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br>>. Acesso em: 6 set. 2006.

BROUWER, A.E.; RAJANUWONG, A.; CHIERAKUL, W.; GRIFFIN, G.E.; LARSEN, R.A.; WHITE, N.J.; HARRISON, T.S. Combination antifungal therapies for HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomised trial. *Lancet.*, v. 263, p. 1764-1767, 2004.

BRUESKE, C.H. Proteolytic activity of a clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* v.23, p.631-633, 1986.

BUCCHANAN, K. L.; MURPHY, J.W. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen ? *Emerg. Infect. Dis.* v.5, 1998.

BULMER, G. S. Twenty-five years with *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*, v. 109, p. 111-22, 1990.

CAICEDO, L. D.; ALVAREZ, I.M.; DELGADO, M.; CARDENAS, A. *Cryptococcus neoformans* in bird excreta in the city zoo of Cali, Colombia. *Mycopathologia*, v.147, p.121-124, 1999.

CALLEJAS, A.; ORDONEZ, N.; RODRIGUEZ, M.C.; CASTANEDA, E. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, from the environment in Colombia. *Med. Mycol.* v.36, p.341-344, 1998.

CANTEROS, C.E.; BRUDNY, M.; RODERO, L.; PERROTA, D.; DAVEL, G. Distribution of *Cryptococcus neoformans* serotypes associated with human infections in Argentina. *Revist. Argent. Microbiol.* v.34, p.213-218, 2002.

CARVALHO, P.B., FERREIRA, E.I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease-review. *Fitoterapia* 72, 599–618, 2001

CARVALHO, V.G.; TERCETI, M.S.; DIAS, A.L.; PAULA, C.R.; LYON, J.P.; SIQUEIRA, A.M.; FRANCO, M.C. Serotype and mating type characterization of *Cryptococcus neoformans* by multiplex PCR. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* v.49, n.4, p.207-10, 2007.

CASADEVALL, A.; FREUNDLICH, L.; MARSH, L.; SCHARFF, M.D. Extensive allelic variation in *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 30, p. 1080-1084, 1992.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J.R. *Cryptococcus neoformans*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1998. 541p.

CASADEVALL, A.; STEENBERGEN, J.N.; NOSANCHUK, J.D. "Ready made" virulence and "dual use" virulence factors in pathogenic environmental fungi - the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 6, p. 332-337, 2003.

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

CHAYAKULKEEREE, M.; SORRELL, T.C.; SIAFAKAS, A.R.; WILSON, C.F.; PANTARAT, N.; GERIK, K.J.; BOADLE, R.; DJORDJEVIC, J.T. Role and mechanism of phosphatidylinositol-specific phospholipase C in survival and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol.* v.69, n.4, p.809-26, 2008.

CHAKRABARTY, T.; BASAK, D. K .; BHOWMIK, M.K.; MAZUMDER, B. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from captive birds. *Indian Vet. J.* v.68, p.517-520, 1991

CHAKRABARTY. A. ; JATANA., M.; KUMAR., P.; CHATHA., L.; KAUSHAL. A., PADHYE. A . A . Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus camaldulensis* in India. *J. Clin. Microbiol.* v.35, p.3340-3342, 1997..

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

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

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, p. 1977–1983, 1996.

CHATURVEDI, S.; RODEGHIER, B.; FAN, J.; MCCLELLAND, C.M.; WICKES, B.L.; CHATURVEDI, V. Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* MAT $\alpha$  and MAT $\alpha$  pheromone to determine mating type, ploidy, and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies. *J. Clin. Microbiol.*, v. 38, p. 2007-2009, 2000.

CHEN, L.C.; BLANK, E.S.; CASADEVALL, A. Extracelular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v. 3, p. 570-574, 1996.

CHEN, S.C. Cryptococcosis in Australasia and the treatment of cryptococcal and other fungal infections with liposomal amphotericin B. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 49, p. 57-61, 2002.

CHEN, S.C.A. ; SORREL, T.C.; NIMMO, G. Epidemiology and host and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zeland. *Clin. Infect. Dis.* v.31, p.499-508, 2000.

CHERNIACK, R.; MORRIS, L.; BELAY, T.; SPITZER, E.; CASADEVALL, A . Variation in the structure of Glucuronoxylomannan in isolates from patients with recurrent Cryptococcal Meningitis. *Infect. Immun.* v.63, p.1889-1905, 1995.

CHERNIAK, R.; SUDSTROM, J.B. Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans* . *Infect. Immun.*, v. 62, p. 1507-1512, 1994.

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

CLANCY, C.J.; NGUYEN, M.H.; ALANDOERFFER, R.; CHENG, S.; ICZKOWSKI, K.; RICHARDSON, M.; GRAYBILL, J.R. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* isolates recovered from persons with AIDS demonstrate a wide range of virulence during murine meningoencephalitis that correlates with the expression of certain virulence factors. *Microbiology*, v. 152, p. 2247-2255, 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Second Edition document M27-A2. Clinical And Laboratory Standards Institute. USA, 2002.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. NCCLS document M38-A.Clinical And Laboratory Standards Institute. USA, 2002.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras: Norma aprovada. 2. ed. Brasília, DF, 2002. p. 1-51. (CLSI Documento M27-A2. v. 22, n. 15)

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

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

COX, G.M.; MUKERJEE, J.; GOLE, G.T.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J.R. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. Infect. Immun., v. 68, p. 443-448, 2000.

CRAMPIN, A.C.; MATTHEWA, R.C.; HALL, D.; EVANS, G.V. PCR fingerprinting *Cryptococcus neoformans* by random amplification of polymorphic DNA. J. Med. Vet. Mycol., v. 31, p. 463-465, 1993.

CRISSEO, G.; GALLO, M.; PERNICE, A. Killer activity at different pHs against *Cryptococcus neoformans* variety *neoformans* serotype A by environmental yeast isolates. Mycoses. v.42, p. 600-608, 1999.

CRISSEY, J. T.; LANG, H.; PARISH, L. C. Manual of Medical Mycology, Spain, Blackwell Science, 1995.

CROSE, E.; MARINKELLE, C.J.; STRINEGEL, C. The use of tissues cultures in the identification of *C. neoformans* isolated from colombian bats. Sabouraudia, v.6, p.127-132, 1967.

CRUZ, L. C. H. et al. Cryptococcosis in cat. First case in Brazil. Revist. Bras. Med. Vet., v. 1, p. 25-28, 1971.

CRUZ, M.C.; FOX, D.S.; HEITMAN, J. Calcineurin is required for hyphal elongation during mating and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*. EMBO. J., v. 20, p. 1020-1032, 2001.

CRUZ, M.C.; SANTOS, P.O.; BARBOSA, A.M.; de MÉLO, D. L.; ALVIANO, C.S.; ANTONIOLLI, A.R.; ALVIANO, D.S.; TRINDADE, R.C. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. São Cristóvão – SE, 2007.

CRUZ, M.C.; SIA, R.A.; OLSON, M.; COX, G.M.; HEITMAN, J. Comparison of the roles of calcineurin in physiology and virulence in serotype D and serotype A strains of *Cryptococcus neoformans*. Infect. Immun., v. 68, p. 982-985, 2000.

CURRIE, B. P.; FREUNDLICH, L. F.; CASADEVALL, A. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Cryptococcus neoformans* isolates from

environmental (pigeon excreta) and clinical sources in New York City. *J. Clin. Microbiol.*, v. 32, p. 1188-1192, 1994.

CURRIE, B.P. ; CASADEVALL, A . Estimation of the prevalence of Cryptococcal infection among HIV infected individuals in New York City . *Clin. Infect. Dis.*, v.19, p.1029-1033, 1994.

DACORSO FILHO, P.; CHAGAS, W. A . Criptococose pulmonar em caprino. *Anais Col. Anat. Bras.* v.3, p.55-69, 1957.

DARZÉ, C.; LUCENA, R.; GOMES, I.; MELO, A. Características clínicas laboratoriais de 104 casos de meningoencefalite criptocócica. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.33, p. 21-26, 2000.

DEL VALLE, L.; PINA OVIEDO, S. HIV disorders of the brain: pathology and pathogenesis. *Front. Biosci.*, v. 11, p. 718–732, 2006.

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

DI STASI, L. C. ; GONZALEZ, F. G. ; SEITO, L. N. ; HIRUMALIMA, C. A. . Liliidae medicinais. In: Luiz Claudio Di Stasi; Clélia Akiko Hiruma-Lima. (Org.). *Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. 2 ed. São Paulo: Editora Unesp, 2002, v. 1, p. 64-78.

DROMER, F. S.; DUPONT, B.; LAPORTE, A. Epidemiology of cryptococcosis in França: a 9-year survey (1985-1993). *Clin. Infect. Dis.*, v.23, p.82-90, 1996.

DROMER, F.; MATHOULIN, S.; DUPONT, B.; BRUGIERE, O.; LETENNEUR, L.; THE FRENCH CRYPTOCOCCOSIS STUDY GROUP. Comparison of the efficacy of amphotericin B and fluconazole in the treatment of cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients: Retrospective analysis of 83 cases. *Clin. Infect. Dis.*, v. 22, p. 154-160, 1996.

DROMER, F.; MATHOULIN PELISSIER, S.; FONTANET, A.; RONIN, O.; DUPONT, B.; LORTHOLARY, O.; FRENCH CRYPTOCOCCOSIS STUDY GROUP. Epidemiology of HIV-associated cryptococcosis in France (1985-2001): comparison of the pre- and post-HAART eras. *AIDS.*, v. 20, p. 555-562, 2004.

DROMER, F.; MATHOULIN-PE LISSIER, S.; LAUNAY, O.; LORTHOLARY, O.; THE FRENCH CRYPTOCOCCOSIS STUDY GROUP. Determinants of Disease

Presentation and Outcome during Cryptococcosis: The CryptoA/D Study J. P. MED., v. 4, N.2, p. 297-308, 2007.

DROMER, F.A .; VARNA, A .; RONIN, A .; MATHOULIN, S.; DUPONT, B. Molecular typing of *Cryptococcus neoformans* serotype D clinical isolates. J. Clin. Microb., v.32, p.2364-2371, 1994.

DRUMMOND, E.D.; REIMÃO, J.Q.; DIAS, A.L.; SIQUEIRA, A.M. Behaviour azole fungicide and fluconazole in *Cryptococcus neoformans* clinical and environmental isolates. Rev Soc Bras Med Trop. v.40, n.2, p.209-1, 2007.

DUFAIT, R.; VELHO, R.; DE VROEY, C. Rapid identification of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* by D-proline assimilation. Mycoses, v.30, p. 483, 1987.

ECEVIT I, CLANCY C, SCHMALFUSS I, et al. The Poor Prognosis of Central Nervous System Cryptococcosis among Nonimmunosuppressed Patients: a Call for Better Disease Recognition and Evaluation of Adjuncts to Antifungal Therapy. *Clin Infect Dis.* v.42, p.1443–1447, 2006.

EGGERT, C.; TEMP, U.; ERICKSSON, K.E. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. Appl. Environ. Microbiol., v. 62, p. 1151-1158, 1996.

ELLIS , D. H.; HOWARD, D. H. Virulence serotype and molecular characteristics of environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var *gattii*. Infect. Immun. v.28, p.164-172, 1992.

ELLIS, D.H.; PFEIFFER, T.J. Natural Habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. J. Clin. Microbiol., v. 28, p. 1642-1644, 1990.

EMMONS, C. The significance of saprophytism in the epidemiology of the mycoses. Trans. N. Y. Acad. Sci., p.157-66 ( series II ), 1954.

EMMONS, C.W. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. J. Bacteriol., v. 62, p. 685-690, 1951.

EMMONS, C.W. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). Am. J. Hyg., v. 62, p. 227-232, 1955.

ENSLEY, P. K.; DAVIS, C. E.; ANDERSON , M. P.; ELETCHER, K. C.; FLETCHER, K. C. Cryptococcosis in a male Beccari crowned pigeon. J. Am. Vet. Med. Assoc., v.175, p.992-994, 1979.

ERGIN, C.; ILKIT, M.; HILMIOGLU, S.; KALELI, I.; GULBABA, A.G.; DEMIRCI, M.; KAYA, S. The first isolation of *Cryptococcus neoformans* from eucalyptus trees

in South Aegean and Mediterranean Regions of Anatolia in Turkey despite Taurus Mountains alkalinity. *Mycopathologia*, v. 158, p. 43-47, 2004.

ERNST, E.J.; YODOI, K.; ROLING, E.E.; KLEPSE, M.E. Rates and extents of antifungal activities of amphotericin B, flucytosine, fluconazole, and voriconazole against *Candida lusitanae* determined by microdilution, Etest, and time-kill methods. *Antimicrob Agents Chemother.* v.46, n.2, p.578-81, 2002

ESCANDON, P.; HUERFANO, S.; CASTANEDA, E. Experimental inoculation of *Terminalia catappa* seedlings with an environmental isolate of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype C. *Biomédica*, v. 22, p. 524:528, 2002.

ESCANDÓN, P.; NGAMSKULRUNGROJ, P.; MEYER, W.; CASTAÑEDA, E. In vitro mating of Colombian isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Biomedica.* v.27, n.2, p.308-14, 2007

FERNANDES, O.L.; COSTA, T. R.; COSTA, M. R.; SOARES, A. J.; PEREIRA, J.S.C.; SILVA, M. R. *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com Aids. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*,v.33, 2000.

FERNANDES, F.F.; DIAS, A.L.T.; RAMOS, C.L.; IKEGASHI, M.; SIQUEIRA, A.M.; FRANCO, M.C. The "in vitro" antifungal activity evaluation of propolis G12 ethanol extract on *Cryptococcus neoformans*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.*, v.49, 2007.

FILIÚ, W.F.O.; MACEDO, C.L.; LAZÉRA, M. Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 35, p. 591-595, 2002.

FORTES, S. T.; LAZERA, M. S.; NISHIKAWA, M. M.; MACEDO, R. C. L.; WANKE, B. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. *Mycoses*, v. 44, p.137-140, 2001.

FOX, D.S.; COX, G.M.; HEITMAN, J. Phospholipid-binding protein Cts1 controls septation and functions coordinately with calcineurin in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell*, v. 2, p. 1025-1035, 2003.

FOX, D.S.; CRUZ, M.C.; SIA, R.A.; KE, H.; COX, G.M.; CARDENAS, M.E.; HEITMAN, J. Calcineurin regulatory subunit is essential for virulence and mediates interactions with FKBP12-FK506 in *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.*, v. 39, p. 835-849, 2001.

FRANZOT, S.P.; HAMDAN, J.S.; CURRIE, B.P. & CASADEVALL, A. - Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Brazil and the United

States: evidence for both local genetic differences and a global clonal population structure. *J. clin. Microbiol.*, v.35, p.2243-2251, 1997.

FRANZOT, S.P.; MUKHERJEE, J.; CHERNIAK, R.; CHEN, L.C.; HAMDAM, J.S.; CASADEVALL, A. Microevolution of standard strain of *Cryptococcus neoformans* resulting in differences in virulence and other phenotypes. *Infect. Immun.*, v.66, p.89-97, 1998.

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

FRIEDMAN, G.D. The rarity of cryptococcosis in Northern California : the 10 year experience of large defined population. *Am. J. Epidemiol.*, v.117, p.230-234, 1983.

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

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

GHANNOUM, M.A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.13, p.122-143, 2000.

GLUCK, J.L.; MYERS, J.P.; PASS, L.M. Cryptococcemia due to *Cryptococcus albidus* south. *Med. J.*, v.80, p.511-513, 1987.

GOKULSHANKAR, S.; RANGANATHAN, S.; RANJITH, M.S.; RANJITHSINGH, A.J. Prevalence, serotypes and mating patterns of *Cryptococcus neoformans* in the pellets of different avifauna in Madras, India. *Mycoses*, v. 47, p. 310-314, 2004.

GRAYBILL, J.R.; MONTALBO, E.; KIRKPATRICK, W.R.; LUTHER, M.F.; REVANKAR, S.G.; PATTERSON, T.F. Fluconazole versus *Candida albicans*: a complex relationship. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 42, p. 2938-2942, 1998.

GRISEO, G.; BOLIGNANO, M.S.; DE LEO, F.; STAIB, F. Evidence of canary droppings as an important reservoir *Cryptococcus neoformans* . *Zentralbl. Bakteriol.*, v. 282, p. 244-254, 1995.

HAHN, R.C.; MACEDO, A.M.; FONTES, C.J.; BATISTA, R.D.; SANTOS, N.L.; HAMDAN, J.S. Randomly amplified polymorphic DNA as a valuable tool for

epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. J. Clin. Microbiol., v. 41, p. 2849-2854, 2003.

HALL-THOMAS, S.; WATSON, K. *Cryptococcus nyarrowii* so. nov., a basidiomycetous yeast from Antarctica. Inst. J. Syst. Evol. Microbiol., v.52, p.1033-1038, 2002.

HALLYDAY, C. L.; CARTER, D. A. Clonal Reproduction and Limited Dispersal in an Environmental Population of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* Isolates from Australia. J. Clin. Microb., v.41, p.703-711, 2003.

HANAFY, A.; KAOCHAROEN, S.; JOVER-BOTELLA, A.; KATSU, M.; IIDA, S.; KOGURE, T.; GONOI, T.; MIKAMI, Y.; MEYER, W. Multilocus microsatellite typing for *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. Med Mycol. v.46, n.7, p.685-96, 2008.

HAYNES-RUMA, P.; BROWNLEE, A. G.; SORREL, T. C. A rapid method for detecting extracellular proteinase activity in *Cryptococcus neoformans* and a survey of 63 isolates. J. Med. Microbiol., v.49, p.733-737, 2000.

HOANG, L.M.; MAGUIRE, J.A.; DOYLE, P.; FYFE, M.; ROSCOE, D.L. *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver Hospital and Health Sciences Centre (1997-2002): Epidemiology, microbiology and histopathology. J. Med. Microbiol., v. 53, p. 935-940, 2004.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz. v.7, p. 1027-31, 2002.

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

HSU, M. M.; CHANG, C.; YOKOYAMA, K.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. Serotypes and mating types of clinical strains of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan. Mycopathologia, v.125, p. 77-81, 1994.

HUFFNAGLE, G.B.; CHEN, G.H.; CURTIS, J.L.; MACDONALD, R.A.; STRIETER, R.M.; TOEWS, G.B. Down-regulation of the afferent phase of T cell-mediated pulmonary inflammation and immunity by a high melanin-producing strain of *Cryptococcus neoformans*. J. Immunol., v. 155, p. 3507-3516, 1995.

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

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

IKEDA, R., NISHIKAWA, A.; SHINODA; FUKAZAWA, Y. Chemical characterization of capsular polysaccharide from *Cryptococcus neoformans* serotype A-D. Microbiol. Immunol., v.29, p.981-991, 1985.

IKEDA, R.; SHINODA, T.; FUKAZAWA, Y.; KAUFMAN, L. Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. J. Clin. Microbiol., v. 16, p. 22-29, 1982.

JOSEPH HORNE, T.; LOEFFLER, R.S.T.; HOLLOMON, D.W.; KELLY, S.L. Amphotericin B resistant isolates of *Cryptococcus neoformans* without alteration in sterol biosynthesis. J. Med. Vet. Mycol., v. 34, p. 223-225, 1996.

KAROS, M.; CHANG, Y.C.; MCCLELLAND, C.M.; CLARKE, D.L.; FU, J.; WICKES, B.L.; KWON-CHUNG, K.J. Mapping of the *Cryptococcus neoformans* MAT $\alpha$  locus: presence of mating type-specific mitogen-activated protein kinase cascade homologs. J. Bacteriol., v. 182, p. 6222-6227, 2000.

KAYSER, O., KIDERLEN, A.F. In vitro leishmanicidal activity of naturally occurring chalcones. Phytotherapy Research 15, 148–152, 2001.

KELLY, S.; LAMB, D.C.; TAYLOR, M.; CORRAN, A.; BALDWIN, B.; POWDERLY, W.G. Resistance to amphotericin B associated with defective sterol - 8 7 isomerase in a *Cryptococcus neoformans* strain from na AIDS patient. FEMS Microbiol. Lett., v. 122, p. 39-42, 1994.

KERKERING, T.M.; DUMA, R.J.; SHADOMY, S. The evolution of pulmonary cryptococcosis: clinical implications from a study of 41 patients with and without compromising host factors. Ann Intern Med. v.94, p.611-6, 1981.

KHAN, M.A.; NASTI, T.H.; OWAIS, M. Incorporation of amphotericin B in tuftsin-bearing liposomes showed enhanced efficacy against systemic cryptococcosis in leucopenic mice. J. Antimicrob. Chemother., v. 56, p. 726-731, 2005.

KHOSRAVI, A.R. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon (*Columba livia*) droppings in northern Iran. Mycopathologia, v.139, p. 93-95, 1997.

KIDD, S.E.; SORRELL, T.C.; MEYER, W. Isolation of two molecular types of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from insect frass. *Med. Mycol.*, v. 41, p. 171-176, 2003.

KIDD, S.E.; BACH, P.J.; HINGSTON, A.O.; MAK, S.; CHOW, Y.; MACDOUGALL, L.; KRONSTAD, J.W.; BARTLETT, K.H. *Cryptococcus gattii* dispersal mechanisms, British Columbia, Canada. *Emerg Infect Dis.* v.13, n.1, p.51-7. 2007

KIELSTEIN, P.; HOTZEL, H.; SCHMALRECK, A.; KHASCHABI, D.; GLAWISCHNING, W. Occurrence of *Cryptococcus* spp in excreta de pigeons and birds. *Mycoses*, v.43, p.7-15, 2000.

KLEPSEK, M.E.; ERNST, E.J.; LEWIS, R.E.; ERNST, M.E.; PFALLER, M.A. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. *Antimicrob Agents Chemother.* v.42, n.5, p.1207-12, 1998.

KOBAYASHI, C.C.; SOUZA, L.K.; FERNANDES ODE, F.; BRITO, S.C.; SILVA, A.C.; SOUSA, E.D.; SILVA, M.D.O.R. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiania, Goias State, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, v. 47, p. 203-207, 2005.

KOHNO, S. Clinical spectrum and management of cryptococcosis in Japan. In: *International Conference on Cryptococcus and cryptococcosis. Abstracts*, p. 73, 1999.

KOTWANI, R.N.; GOKHALE, P.C.; BODHE, P.V.; KIRODIAN, B.G.; KSHIRSAGAR, N.A. Safety and efficacy of liposomal amphotericin B in patients with cryptococcal meningitis. *J. Assoc. Physicians India*, v. 49, p. 1086-1890, 2001.

KOZEL, T. R.; HERMERATH, C. A. Binding of cryptococcal polysaccharide to *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.*, v.43, p. 876-879, 1984.

KRAUS, P.R.; FOX, D.S.; COX, G.M.; HEITMAN, J. The *Cryptococcus neoformans* MAP kinase Mpk1 regulates cell integrity in response to antifungal drugs and loss of calcineurin function. *Mol. Microbiol.*, v. 48, p. 1377-1387, 2003.

KRAUS, P.R.; NICHOLS, C.B.; HEITMAN, J. Calcium- and calcineurin-independent roles for calmodulin in *Cryptococcus neoformans* morphogenesis and high-temperature growth. *Eukaryot. Cell*, v. 4, p. 1079-1087, 2005.

KREGER-VAN R. I. J.; N.J.W. (Ed) *The Yeasts : a taxonomic study*. 3<sup>rd</sup> Edition. Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands, p.1082, 1984.

KROHNE, S. G. Canine systemic fungal infections. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Prat.*, v.30 p.1063-1090, 2000.

KURTZMAN, C. P., FELL. J. W. Classification of the basidiomycetous taxa. In: *The Yeasts. A taxonomic study. Fourth Revised and Enlarged Edition*, Amsterdam, 1998.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. *The yeasts, a taxonomic study*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science, 1998. 1055p.

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

KWON-CHUNG K. J.; VARMA A.; HOWARD D. H. Ecology of *Cryptococcus neoformans* and non-AIDS associated cryptococcosis . In: van den Bossche H. Mackenzie DWR, Cauwenbergh G. et al, eds. *Mycoses in Aids patients*. New York, NY: Plenum Press 1990: 103-13

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

KWON-CHUNG, K. J.; WICKES, B. L.; BOOTH, J. L.; VISHNIAC, H. S.; BENNETT, J. E. Urease inhibition by EDTA in the two varieties of *Cryptococcus neoformans* . *Infect. Immun.*, v.55, p. 1751-1754 ,1987.

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

KWON-CHUNG, K.J. The discovery of creatinine assimilation in *Cryptococcus neoformans* and subsequeute work on the characterization of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* . *Zentralbl. Bakteriol.*, v. 275, p. 390-393, 1991.

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

KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E.; RHODES, J.C. Taxonomic studies on *Filobasidiella* species and their anamorphs. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 48, p. 25-38, 1982.

KWON-CHUNG, K.J.; BOEKHOUT, T.; FELL, J.W.; DIAZ, M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (*Basidiomycota, Hymenomyces, Tremellomycetidae*). *Taxon*, v. 51, p. 804-806, 2002.

KWON-CHUNG, K.J.; WICKES, B.L.; STOCKMAN, L.; ROBERTS, G.D.; ELLIS, D.; HOWARD, D.H. Virulence, serotype, and molecular characteristics of environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Infect. Immun.*, v. 60, p. 1869-1874, 1992.

KWON-CHUNG, K. J.; Pfeiffer, T.; CHANG, Y. C.; Wickes, B. L.; Mitchell, D.; Stern, J. J. Molecular biology of *Cryptococcus neoformans* and therapy of cryptococcosis. *J. Med. Vet. Mycol.*, v.32, p.407-415, 1994

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. *Tratado de Micologia Médica*. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1082p.

LARSEN, R.A.; BAUER, M.; THOMAS, A.M.; GRAYBILL, J.R. Amphotericin B and fluconazole, a potent combination therapy for cryptococcal meningitis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 48, p. 985-991, 2004.

LAZERA, M. S.; PIRES, F. D. A.; CAMILO-COURA, L.; NISHIKAWA, M. M.; BEZERRA, C. C. F.; TRILLES, L. and WANKE, B. Natural Habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. *J. Med. Vet. Mycol.*, v. 34, p. 127-131, 1996.

LAZERA, M. S.; WANKE, B. and NISHIKAWA, M. M. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J. Med. Vet. Mycol.*, v. 31, p. 449-454, 1993.

LAZERA, M.S.; CAVALCANTI, M.A.S.; LONDERO, A.T.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M.M.; WANKE, B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans* *Med. Mycol.*, v. 38, p. 379-383, 2000.

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

LENGELER, K.B.; FOX, D.S.; FRASER, J.A.; ALLEN, A.; FORRESTER, K.; DIETRICH, F.S.; HEITMAN, J. Mating-type locus of *Cryptococcus neoformans* : a step in the evolution of sex chromosomes. *Eukaryot. Cell.*, v. 1, p. 704-718, 2002.

LEVITZ, S.M. The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. *RID*, v.13 p. 1163-1169, 1991.

LEAL AL, FAGANELLO J, FUENTEFRIA AM, BOLDO JT, BASSANESI MC, VAINSTEIN MH. Epidemiological profile of cryptococcal meningitis patients in rio grande do sul, Brazil. *Mycopathologia*. v.166, n.2, p.71-5, 2008.

LEWIS, R.E.; DIEKEMA, D.J.; MESSER, S.A.; PFALLER, M.A.; KLEPNER, M.E. Comparison of Etest, chequerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. *J Antimicrob Chemother.* v.49, n.2, p.345-51, 2002.

LICEA, B.A.; GARZA, D.G.; ZÚÑIGA, M.T. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* de *Eucaliptus tereticornis*. *Rev. Iberoam. Micol.*, v. 13, p. 27-28, 1996.

LIN, X.; PATEL, S.; LITVINTSEVA, A.P.; FLOYD, A.; MITCHELL, T.G.; HEITMAN, J. Diploids in the *Cryptococcus neoformans* serotype a population homozygous for the alpha mating type originate via unisexual mating. *PLoS Pathog.* v.5, n.1, p.e1000283, 2009

LIN, X.; NIELSEN, K.; PATEL, S.; HEITMAN, J. Impact of mating type, serotype, and ploidy on the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* v.76, n.7, p.2923-38, 2008.

LINDENBERG Ade S, CHANG MR, PANIAGO AM, LAZÉRA Mdos S, MONCADA PM, BONFIM GF, NOGUEIRA SA, WANKE B. Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. [Rev Inst Med Trop Sao Paulo](#). v.50, n.2, p.75-8, 2008.

LITMAN, M.L.; BOROK. Relation of the pigeon to cryptococcosis : natural carrier state, heat resistance and survival of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathol.Micol.*, v.35, p.329-345, 1968.

LITVINTSEVA, A.P.; KESTENBAUM, L.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T.G. Comparative analysis of environmental and clinical populations of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, p. 556-564, 2005.

LITVINTSEVA, A.P.; LIN, X.; TEMPLETON, I.; HEITMAN, J.; MITCHELL, T.G. Many globally isolated AD hybrid strains of *Cryptococcus neoformans* originated in Africa. *J. PPat*, v.3, n.8, 2007.

LITVINTSEVA, A.P.; THAKUR, R.; RELLER, B.; MITCHELL, T.G. Prevalence of Clinical Isolates of *Cryptococcus gattii* Serotype C among Patients with AIDS in Sub-Saharan Africa. *J. Infect. Disease.*, v. 192, p. 888-892, 2005.

LIU, L.; TEWARI, R. P.; WILLIAMSON, P. R. Lacase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. *Infect. Immun.*, v.67. p.6034-6039, 1999.

LONGLEY, N.; MUZOORA, C.; TASEERA, K.; MWESIGYE, J.; RWEBEMBERA, J.; CHAKERA, A.; WALL, E.; ANDIA, I.; JAFFAR, S.; HARRISON, T.S. Dose response effect of high-dose fluconazole for HIV-associated cryptococcal meningitis in southwestern Uganda. *Clin Infect Dis.* v.47, n12, p.:1556-61, 2008.

LOPES, J. O .; COSTA, J. M.; STREHER, L. A .; CLOCK, C.; PINTO, M. S.; ALVES, S. H. Criptococose não associada à AIDS no Rio Grande do Sul : relato de oito casos e revisão da literatura Sul-Riograndense. *Revist. Soc. Bras.Med. Trop.*, v.30, 1997.

LOPES-MARTINEZ, R.; CASTANON-OLIVARES, L.R. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from bird droppings, fruits and vegetables in Mexico City. *Mycopathologia*, v. 129, p. 25-28. 1995.

MACHADO, C. C.; AMARAL, A.A.; SEVERO, L.C. *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* isolado do solo. *Rev. Inst. Med.Trop.São Paulo.*, v.35, p.77-79,1993.

MAHMOUD, Y. A . First environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and var. *gattii* from the Gharbia Governorate, Egypt. *Mycopathologia*, v.148, p. 83-86,1999.

MANDRIOLI, L.; BETTINI, G.; MARCATO, P.S.; BENAZZI, C.; SALDA, L. D.; KROCKENBERGER, M. B.; JENSEN, H. E. Central nervous system Cryptococcoma in a cat. *J. Vet. Med.* v.49, p.526, 2002.

MARAIS, E.; STEWART, R.; DUSE, A.G.; ROSEKILLY, I.C.; DE JONG, G.; AITHMA, N. *Candida parapsilosis* detected in TPN using the Bact/Alert system and characterized by randomly amplified polymorphic DNA. *J. Hosp. Infect.*, v. 56, p. 291-296, 2004.

MARTINEZ, R.; VITALI, L.H.; HENRIQUES, J.H.S.; MACHADO, A.A ; ALBERNAZ.; LIMA, A.A. Inquérito soropidemiológico para infecções por fungos causadores de micoses sistêmicas na Reserva Indígena Xacriabá, Estado de Minas Gerais. *Revist. Soci. Brasil. Medec. Trop.*, v.35, 2002.

MASIGA, D. K.; TAIT, A.; TURNER, C. M. R. Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism in parasite genetics. *Parasitol. Today*, v. 16, p. 350-353, 2000.

MATSUMOTO, M.T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; BAEZA, L.C.; MELHEM, M.S.; MEDES-GIANNINI, M.J. 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.41-47, 2008.

MCCLELLAND, C.M.; CHANG, Y.C.; VARMA, A.; KWON-CHUNG, K.J. Uniqueness of the mating system in *Cryptococcus neoformans*. Trends Microbiol., v. 12, p. 208-212, 2004.

MEYER, W.; CASTANEDA, A.; JACKSON, S.; HUYNH, M.; CASTANEDA, E, IBEROAMERICAN CRYPTOCOCCAL STUDY GROUPY. Emerging Infectious Diseases. v.9, 2003.

MEYER, W.; CASTAÑEDA, A.; JACKSON, S.; HUYNH, M.; CASTAÑEDA, E.; IBERO AMERICAN CRYPTOCOCCAL STUDY GROUP. Molecular Typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. Emerg. Infect. Dis., v. 9, p. 189-195, 2003.

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

MEYER, W.; MARSZEWSKE, K.; AMIRMOSTOFIN, M.; IGREJA, R. P.; HARDTKE C.; METHLING, K.; VIVIANE, M.A.; CHINDAMPORN, A.; SUKROONGREUNG, S.; JOHN, M. A.; ELLIS, D. H.; SORREL, T. C. Molecular Typing isolates of *Cryptococcus neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA – a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. Electrophoresis, v.20, p.1790-1799, 1999.

MEYER, W.; MITCHELL, T. G.; FREEDMAN, E. Z.; VILGALYS, R. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. J. Clin. Microbiol., v. 31, p. 2274-2280, 1993.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução nº 336, de 22 de julho de 1999, Publicada DOU-30/07/1999 site: <http://e-legis.bvs.br>, acesso em 13/10/2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 57, de 12 de julho de 1995, Publicada DOU-26/07/1995 site: <http://e-legis.bvs.br>, acesso em 13/10/2005.

MISHIRA, S. K.; STAIB, F.; FOLKENS, U.; FROMTLING, R. A. Serotypes of *Cryptococcus neoformans* strains isolated in Germany. J. Clin. Microbiol., v.14, p.106-107, 1981

MITCHEL, T. G. Micoses Sistêmicas in: Microbiologia . 17a . Buenos Aires , Panamericana, p. 1247-1276, 1983.

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

MONTAGNA, M.T.; SANTACROCE, M.P.; CAGGIANO, G.; TATO, D.; AJELLO, L. Cavernicolous habitats harbouring *Cryptococcus neoformans* : results of a speleological survey in Apulia, Italy, 1999-2000. Med. Mycol., v. 41, p. 451-455, 2003.

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

MORACE, G.; ARCHIBUSACI, C.; SESTITO, M.; POLONELLI, L. Strain differentiation of pathogenic yeast by the killer system. Mycopathologia, v.84, p. 81-85, 1984.

MOREIRA, T.A.; FERREIRA, M.S.; RIBAS, R.M.; BORGES, A.S. Cryptococcosis: clinical epidemiological laboratorial study and fungi varieties in 96 patients. Rev Soc Bras Med Trop. v.39, n.3, p.255-8. 2006

MOTTA, T.R.; MOREIRA-FILHO, C.A.; MENDES, R.P.; SOUZA, L.R.; SUGIZAK, M.F.; BAUEB, S.; CALICH, V.L.; VAZ, C.A. Evaluation of DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers (RAPD) as genetically associated elements to differentiate virulent and non-virulent *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. FEMS Immunol. Med. Microbiol., v. 33, p.151-157, 2002.

NARASIPURA, S.D.; CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S. Characterization of *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* SOD2 reveals distinct roles of the two superoxide dismutases in fungal biology and virulence. Mol. Microbiol., v. 55, p. 1782-800, 2005.

NGAMWONGSATT, P.; SUKROONGREUNG, S.; NILAKUL, C.; PRACHAYASITTIKUL, V.; TANTIMAVANICH, S. Electrophoretic karyotypes of *C. neoformans* serotype A recovered from Thai patients with AIDS. Mycopathologia, v. 159, p. 189-197, 2005.

NIELSON, J.B.; IVEY, M.H.; BULMER, G.S. *Cryptococcus neoformans* : pseudohyphal forms surviving culture with *Acanthamoeba polyphaga*. *Infect. Immun.*, v. 20, p. 262-266, 1978.

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

NOSANCHUCK, J. D.; VALADON, P.; FELDMESSER, M.; CASADEVALL, A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* in murine infection. *Mol. Cell. Biol.*,v.19, p.745-750,1999.

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

NOUT, M.J.; PLATIS, C.E.; WICKLOW, D.T. Biodiversity of yeasts from Illinois maize. *Can. J. Microbiol.* V. 89, n.3, p. 362-367, 1997.

NOVERR, M.C.; COX, G.M.; PERFECT, J.R.; HUFFNAGLE, G.B. Role of PLB1 in pulmonary inflammation and cryptococcal eicosanoid production. *Infect. Immun.*, v. 71, p. 1538-1547, 2003.

NURNBURG, P.; ROEWER, L.; NEITZEL, H.; SPERLING, K.; POPPERL, A.; HUNDRIESER, J.; POCHE, H.; EPPLER, C.; ZISCHLER, H.; EPPLER, J.T.. DNA fingerprinting with the oligonucleotide probe (CAC)<sub>5</sub> (GTS)<sub>5</sub>: Somatic stability and germline mutations. *Hum Genet .*, v.84, p.75-78, 1989.

NYSHIKAWA, M. M.; LAZERA, M. S.; BABOSA, G. G.; TRILLES, L.; BALASSIANO, B. R.; MACEDO, R. C.; BEZERRA, C. C.; PEREZ, M. A; CARDIRELLI, P.; WANKE, B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil : analysis host and regional patters. *J. Clin. Microbiol.*, v. 4, p.73-77, 2003.

NYSHIKAWA, M. M.; LEITE, P.; CAVALCANTE, M. A .; Serotyping of *Cryptococcus neoformans* isolates of clinical and environmental sources from Brazil. In: Program and Abstracts of the 4 th International Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis, London, UK, September 12-16, 1999. London: The Royal Society, 1999: PC 21. Abstract.

ODOM, A.; MUIR, S.; LIM, E.; TOFFALETTI, D.L.; PERFECT, J.; HEITMAN, J. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. EMBO J., v. 16, p. 2576-2589, 1997.

OHKUSU, M.; TANGONAN, N.; TAKEO, K. Serotyping, mating type and ploidy of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from patients in Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v. 44, p. 299-302, 2002.

OLSZEWSKI, M.A.; NOVERR, M.C.; CHEN, G.H.; TOEWS, G.B.; COX, G.M.; PERFECT, J.R.; HUFFNAGLE, G.B. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. Am. J. Pathol., v. 164, p. 1761-1771, 2004.

OZEKI, H.; ITO, S.; WAKAMATSU, K.; ISHIGURO, I. Chemical characterization of pheomelanogenesis starting from dihydroxyphenylalanine or tyrosine and cysteine. Effects of tyrosinase and cysteine concentrations and reaction time. Biochim. Biophys. Acta., v. 1336, p. 539-548, 1997a.

OZEKI, H.; WAKAMATSU, K.; ITO, S.; ISHIGURO, I. Chemical characterization of eumelanins with special emphasis on 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid content and molecular size. Anal. Biochem., v. 248, p. 149-157, 1997b.

PADHYE, A. A.; CHAKRABARTY, A.; CHANDER, J.; KAUFMAN, L. *Cryptococcus neoformans* var *gattii* in India. J. Med. Vet. Mycol., v.31, p.165-168, 1993.

PAL, M. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and munia birds. Mycoses. v.32, p.250-2, 1989.

PAL, M. First report of isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from avian excreta in Kathmandu, Nepal. Rev. Iberoam. Micol., v. 14, p. 181-183, 1997.

PAPPALARDO MC, PASCHOAL RC, MELHEM MS. AIDS-associated central nervous system cryptococcosis: a Brazilian case study. AIDS. v.21, n.14, p.1971-2, 2007.

PAPPALARDO MC; MELHEM MS. Cryptococcosis: a review of the brazilian experience for the disease. Rev. Inst. Med. Trop. v.45, n.6, p.299-305, 2003.

PASSONI, L.F.C.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M.M.; LAZERA, M.S. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro: an

analysis of domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. *Med. Mycol.*, v.36, p.305-311, 1998.

PASSOS, X.S.; SANTOS, S. D.A.C.; FERRI, P. H.; FERNANDES, O.D.E.F.; PAULA, T.D.E.F.; GARCIA, A.C.; SILVA, M.D.O.R. Antifungal activity of *Caryocar brasiliensis* (*Caryocaraceae*) against *Cryptococcus neoformans*. *Rev. Soc. Brás. Méd. Trop.*, v. 35, p. 623-7, 2002.

PAPPAS PG, PERFECT JR, CLOUD GA, et al. Cryptococcosis in Human Immunodeficiency Virus-negative Patients in the Era of Effective Azole Therapy. *Clin Infect Dis.* v.33, p.690–699, 2001.

PERFECT, J. R.; MAGEE, B. B.; MAGEE, P. T. Separation of chromosomes of *Cryptococcus neoformans* by pulsed field gel electrophoresis. *Infect. Immun.*, v.57, p.2624-2627, 1989.

PERSON, C. Phylogeny of the neotropical *Alibertia* group (*Rubiaceae*), with emphasis on the genus *Alibertia*, inferred from ITS and 5S ribosomal DNA sequences. *Am. J. Botany.* v. 87, n.7, p.1018-1028, 2000.

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

PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R.J.; RICE, C.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D.J. In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and fluconazole against 4,169 clinical isolates of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* collected during 2001 and 2002 in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 48, p. 201-205, 2004.

PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; HOLLIS, R.J.; JONES, R.N. In vitro activities of posaconazole (Sch 56592) compared with those of itraconazole and fluconazole against 3,685 clinical isolates of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 45, p. 2862-2864, 2001.

PFEIFFER, T.; ELLIS, D. Additional eucalypt hosts for *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR HUMAN AND ANIMAL MYCOLOGY, 13th., 1997, Parma, Italy. Abstract North Adelaide, Australia: International Society for Human and Animal Mycology, 1997. p.106.

PFEIFFER, T.J.; ELLIS, D. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tireticornis*. J. Med. Vet. Mycol., v. 30, p. 407-408, 1992.

POLACHECK, I.; KWON-CHUNG, K. J. Creatinine metabolism in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus bacillisporus*. J. Bacteriol. v.142, p.15-20, 1980.

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

POWDERLY WG. Cryptococcal meningitis and AIDS. *Clin Infect Dis*. 1993;17:837-842.

PROGRAMA BIOTA/FAPESP. site: <http://www.biota.org.br>, acesso em 26/08/2005

RANDHAWA, H.S.; MUSSA, A.Y.; KHAN, Z.U. Decaying wood in tree trunk hollows as a natural substrate for *Cryptococcus neoformans* and other yeast-like fungi of clinical interest. Mycopathologia, v. 151, p. 63-69, 2001.

RASO, T.F.; WERTHER, K.; MIRANDA, E.T.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Cryptococcosis outbreak in psittacine birds in Brazil. Med. Mycol., v.42, p.355-362, 2004.

REFAL, M.; TABA, M.; SELIM, A.; ELSHABOURII, F.; YOUSSEFF, H. H. Isolation of *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* and other yeasts from pigeon droppings en Egypt. Sabouraudia, v.21, p.163-165, 1983.

REIMÃO, J.Q.; DRUMMOND, E.D.; TERCETI, M.S.; LYON, J.P.; FRANCO, M.C.; SIQUEIRA, A.M. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from hollows of living trees in the city of Alfenas, MG, Brazil. Mycoses.v.50, n.4 p.261-4, 2007.

REZENDE, C. - Aspectos fenotípicos e moleculares de amostras de *Cryptococcus neoformans* da região de Araraquara e Ribeirão Preto, relacionados aos perfis de suscetibilidade. Araraquara, 2002. (Dissertação de Mestrado - Instituto de Química/UNESP).

RITTERSHAUS, P.C.; KECHICHIAN, T.B.; ALLEGOOD, J.C.; MERRILL, A.H.J.R.; HENNIG, M.; LUBERTO, C.; DEL POETA, M. Glucosylceramide synthase is an essential regulator of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. J. Clin. Invest., v. 116, p. 1651-1659, 2006.

ROBERT, F.; LEBRETON, F.; BOUGNOUX, M.E.; PAUGAM, A.; WASSERMANN, D.; SCHLOTTERER, M.; TOURTE-SCHAEFER, C.; DUPOUY-CAMET, J. Use of random amplified polymorphic DNA as a typing method for *Candida albicans* in epidemiological surveillance of a burn unit. *J. Clin. Microbiol.*, v. 33, p. 2366-2371, 1995.

RODERO, L.; CÓRDOBA, S.; CAHN, P.; SORIA, M.; LUCARINI, M.; DAVEL, G.; KAUFMAN, S.; CANTEROS, C.; GUELFAND, L. Timed-kill curves for *Cryptococcus neoformans* isolated from patients with AIDS. *Med Mycol.* v.38, n.3, p.201-7, 2000.

RODRIGUES, M.L.; REIS, F.C.G.; PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L.R.; ALVIANO, C.S. Cleavage of human fibronectin and other basement membrane-associated proteins by a *Cryptococcus neoformans* serine proteinase. *Microb. Pathog.*, v. 34, p. 65-71, 2003.

RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. The resistance of opportunistic fungi to antifungals. *Rev. Clin. Esp.*, v. 197, p. 67-74, 1997.

RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; BERENGUER, J.; MARTINEZ-SUAREZ, J.V.; SANCHEZ, R. Comparison of a spectrophotometric microdilution method with RPMI-2% glucose with the National Committee for Clinical Laboratory Standards Reference Macrodilution Method M27-P for in vitro susceptibility testing of amphotericin B, flucytosine and fluconazole against *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemoter.*, v. 40, p. 1998-2003, 1996.

ROJAS, J. J.; OCHOA, V. J.; OCAMPO S. A.; MUÑOZ, J. F. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Complement. Altern. Med.*, v. 6, p.2, 2006.

ROZEMBAUM, R.; GONÇALVES, A.J.R. Clinical epidemiological study of 171 cases of cryptococcosis. *Clin. Infect. Dis.*, v.18, p.369-380, 1994.

RUHNKE, M.; GROSCH-WORNER, I.; LISCHEWSKI, A.; NEUBAUER, A.; STEINMULLER, A.; TRAUTMANN, M.; MORSCHHAUSER, J. Genotypic relatedness of yeast isolates from women infected with human immunodeficiency virus and their children. *Mycoses*, v. 42, p. 385-394, 1999.

RUIZ, A.; VELEZ, D.; FROMTLING, R. Isolation of saprophytic *Cryptococcus neoformans* from Puerto Rico: distribution and variety. *Mycopathologia*, v. 106, p. 167-70, 1989.

SANFELICE, F. Contributo alla morfologia e biologia blastomiceti che si wihppana nei succhi di alcunifrutti. Ann. Ing., v.4, p.463-465, 1894.

SANT'ANA, F. J. F.; MAIA, F. C. L.; FILHO, J. B. G.; SILVEIRA, A. B.; SILVA, V. R. Criptococose em felino. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. v. 51, 1999.

SABETA, J.R.; ANDRIOLE, V.T. Cryptococcal infection of the central nervous system. Med Clin North Am. v.69, p.333-44, 1985.

SAVELKOUL, P. H. M.; AARTS, H. J. M.; DE HAAS, J., DIJKSHOORN, L.; DUIM, B.; OTSEN, M.; RADEMAKER, J. L. W.; SCHOOLS, L.; LENSTRA, J. A. Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis: the State of an art. J. Clin. Microbiol., v. 37, p. 3083–3091, 1999.

SAWANT, A. D.; AHEARN, D. G. Involvement of a cell wall receptor in the mode of na anti-Candida toxin of *Pichia anomala*. Antimicrob. Agents Chemother., v.34, 1990.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A.M.F.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S. ; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp and *Cryptococcus* sp. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. 28: 25-34,2007.

SILVA, V.C.; FARIA, A. O.; BOLZANI, V.S.; LOPES, M.N. A New ent-Kaurane Diterpene from Stems of *Alibertia macrophylla* K. Schum. (Rubiaceae). Helvetica Chimica Acta, v. 90, p. 1781-1785, 2007.

SILVA, V.C.; GIANNINI, M.J.S.M.; CARBONE, V.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; BOLZANI, V.S.; LOPES, M.N. New Antifungal Terpenoid Glycosides from *Alibertia edulis* (Rubiaceae). Helvetica Chimica Acta, v. 91, p. 1355-1362, 2008

SLOAN, D.; DLAMINI, S.; PAUL, N.; DEDICOAT, M. Treatment of acute cryptococcal meningitis in HIV infected adults, with an emphasis on resource-limited settings. Cochrane Database Syst Rev. v.8, n.4, p:CD005647,.2009

SOARES, C.M.; MADLUN, E.E.; DA SILVA, S.P.; PEREIRA, M.; FELIPE, M.S. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. J. Clin. Microbiol., v. 33, p. 505-507, 1995.

SORRELL, T.C. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, Med. Mycol., v. 39, p. 155-168, 2001.

SOUZA, L.K.; FERNANDES ODE, F.; KOBAYASHI, C.C.; PASSOS, X.S.; COSTA, C.R.; LEMOS, J.A.; SOUZA-JUNIOR, A.H.; SILVA, M.D.O.R. Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Goiania city, Goias, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, v. 47, p. 253-256, 2005.

STAIB, F.; SEIBOLD, M.; ANTWEILER, B.; FROHLICH, B.; WEBER, S. The brow colour effect (BCE) of *Cryptococcus neoformans* in the diagnosis, control and epidemiology of *C. neoformans* infections in AIDS patients. Zentbl. Bakteriologie Mikrobiologie, v.266. p.167-177, 1987.

STAIB, F. *Cryptococcus neoformans* and *Guizotia abyssinica* (Sn. G. ollifera). Z. Hyg. Infektionskr., v. 148, p. 466-475, 1962.

STAIB, F.; SCHULZ-DIETRICH, J.M. *Cryptococcus neoformans* in fecal matter of birds kept in cages control of *Cryptococcus neoformans* habitats. Zentrallb. Bakteriologie Mikrobiologie Hyg., v. 179, p. 179-186, 1984.

STEENBERGEN, J. N.; CASADEVALL, A . Prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) and *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A) isolates in New York City. J. Clin. Microb., v.38, p.1974-1976, 2000.

STEENBERGEN, J.N.; SHUMAN, H.A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoeba suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. Microbiology, v. 98, p. 15245-15250, 2001.

SWAMINATHAN, B.; MATAR, G. M. Molecular typing methods. In: SWAMINATHAN, B.; MATAR, G. M. (ed), Diagnostic molecular biology. ASM Press, Washington DC, p.26-50, 1994.

SWINNE, D. Ecology of *Cryptococcus neoformans* and epidemiology of cryptococcosis in the old world. In: Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, 10, 1988, Barcelona. Abstracts., p. 113-119.

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

SWINNE, D.; TAELEMAN, H.; BATUNGWANAYO, J.; BIGIRANKANA, A.; BOGAERTS, J. Ecology of *Cryptococcus neoformans* in Central Africa. Med. Trop. (Madr), v.54, p.53-55, 1994.

SWINNE., D.; NKURIKIYINFURA, J. B.; MUYER, T. L. Clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Zaire. Eur. J. Clin. Microbiol., v. 5, p.50-51, 1986.

SWINNE-DESGAIN, D. *Cryptococcus neoformans* of saprophytic origin. *Sabouraudia*, v. 13, p.303-308, 1975.

SWINNE-DESGAIN, D.; DEPPNER, M.; MANIRATUNGA, S.; LAROCHE, R.; FLOCH, J. J.; KADENDE, P. AIDS – associated cryptococcosis in Bujumbura, Burundi : na epidemiological study. *J. Med. Vet. Mycol.*, v.29, p.25-30, 1991.

TAELMAN, H.; CLARENINX, J.; KAGAME, A.; BATUNGWANAYO, J.; NYIRABAREJA, A.; BOGAERTS, J. Cryptococcosis, another growing burden in Central Africa. *Lancet.*, v.338, p.761, 1991.

TAY, S.T.; CHAI, H.C.; NA, S.L.; HAMIMAH, H.; ROHANI, M.Y.; SOO-HOO, T.S. The isolation, characterization and antifungal susceptibilities of *Cryptococcus neoformans* from bird excreta in Klang Valley, Malaysia. *Mycopathologia*, v. 159, p. 509-513, 2005.

TAYLOR, M. B.; CHADWICK, D.; BARKHAM, T. First reported isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a patient in Singapore. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, p.3098-3099, 2002.

TIPPER, D. J. ; BOSTIAN, K. A . *Microbiol. Revist.*, 48, 125-156, 1984.

TRILLES, L.; LAZERA, M.; WANKE, B.; THEELEN, B.; BOEKHOUT, T. Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. *Med. Mycol.*, v. 41, p. 383-390, 2003.

TRINDADE, R. C.; RESENDE, M. A.; SILVA, C. M.; ROSA, C.A. Yeasts associated with fresh and frozen pulps of Brazilian tropical fruits. *Syst. Appl. Microbiol.*, v. 25, p.294-300, 2002.

VADEKERTIOVÁ, R.; SLAVIKOVA, E. Killer activity of yeasts isolated from the water environment . *Can. J. Microbiol.*, v.41, p.759-766, 1995.

VAN DER HORST, C.M.; SAAG, M.S.; CLOUD, G.A.; HAMILL, R.J.; GRAYBILL, J.R.; SOBEL, J.D.; JOHNSON, P.C.; TUAZON, C.U.; KERKERING, T.; MOSKOVITZ, B.L.; POWDERLY, W.G.; DISMUKES, W.E. Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.*, v. 337, p. 15-21, 1997

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J.D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 46, p. 3394-3400, 2002.

VAN DUIN, D.; CLEARE, W.; ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J.D. Effects of voriconazole on *Cryptococcus neoformans*. Antimicrob. Agents Chemother., v. 48, p. 2014-2020, 2004.

VARMA, A.; SWINNE, D.; STAIB, F.; BENNETT, J. E.; KWON-CHUNG, K. J. Diversity of DNA fingerprints in *Cryptococcus neoformans*. J. Clin. Microbiol., v. 33, p. 1807-1814, 1995.

VARNA, A. ; KWON-CHUNG, K. J. DNA probes for strain typing of *Cryptococcus neoformans*. J. Clin. Microbiol., v.30, p.2960-2967, 1992.

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

VISHNIC, H. S. *Cryptococcus tephrensensis* sp. Nov. And *Cryptococcus haeimaeyensis* sp. nov.; new anamorphic basidiomycetous yeast species from Iceland. Can. J. Microbiol., v. 48, p. 463-467, 2002.

VIVALDINI, S.M. - Tipagem molecular de isolados sequenciais de *Cryptococcus neoformans* de pacientes da região de São José do Rio Preto e correlação com sensibilidade a drogas antifúngicas. Araraquara, 2003. (Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista).

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

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

WEISING, K.; RAMSER, J.; KAEMMER, D.; KAHL, G. Multilocus DNA fingerprinting and genetic relatedness in plants: a case study with banana and tomato. REVIEW. E.X.S. v.69, p.45-59, 1994.

WHITE, T.C.; KIEREN, A.M.; BOWDEN, R.A. Clinical, cellular, and molecular factor that contribute to antifungal drug resistance. Clin. Microbiol. Rev., v. 11, p. 382-402, 1998.

WICKES, B. L.; MOORE, T. D. E.; KWON-CHUNG, K. J. Comparison of the electrophoretic karyotypes and chromosomal location of *tem* genes in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. J. Clin. Microbiol., v. 140, p. 543-550, 1994.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKY, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; RAFALSKY, J.A.; TINGEY, S.V. Genetic analysis with RAPD markers. In: BENNETT, J.W.; LAZUR, L.L. (Eds.). *More gene manipulations in fungi*. New York: Academic Press, 1991. p. 431-439.

WILLIAMSON, P. R. Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Front. Biosci.*, v.2, p.99-107, 1997.

WILLIAMSON, P.R.; WAKAMATSU, K.; ITO, S. Melanin Biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. *J. Bacteriol.*, v. 180, p. 1570-1572, 1998.

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

XU, J.; ALI, R.Y.; GREGORY, D.A.; AMICK, D.; LAMBERT, S.E.; YOELL, H.J.; VILGALYS, R.J.; MITCHELL, T.G. Uniparental mitochondrial transmission in sexual crosses in *Cryptococcus neoformans*. *Curr. Microbiol.*, v. 40, p. 269-273, 2000.

YAMAMOTO, Y.; KOHNO, S.; KOGA, H.; KAKEYA, H.; TOMANO, K.; KAKU, M.; YAMAZAKI, T.; ARISAWA, M.; HARA, K. Random Amplified polymorphic DNA analysis of clinically and environmentally isolated *Cryptococcus neoformans* in Nagasaki. *J. Clin. Microbiol.*, v. 33, p. 3328-3332, 1995.

ZARAGOZA, O.; MIHU, C.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J.D. Effect of amphotericin B on capsule and cell size in *Cryptococcus neoformans* during murine infection. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 49, p. 4358-4361, 2005.

ZIMMER, B. L.; HEMPEL, H. O.; GOODMAN, N. C. Pathogenicity of the basidiospores of *Filobasidiella neoformans*. *Mycopathologia*, v.85, p.49-153. 1984.

ZUGER, A.; LOUIE, E.; HOLZMAN, R.S.; SIMBERKOFF, M.S.; RAHAL, J.J. Cryptococcal disease in patients with the acquired immunodeficiency syndrome: diagnostic features and outcome of treatment. *Ann. Intern. Med.*, v. 104, p. 234-240, 1986.