



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

JAIME DAVID ACOSTA ESPAÑA

EFEITO DOS INIBIDORES DA BOMBA DE PRÓTONS NA SENSIBILIDADE *IN VITRO* E INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE MELANINA EM *Cryptococcus* spp.

FORTALEZA-CE

2017

JAIME DAVID ACOSTA ESPAÑA

**EFEITO DOS INIBIDORES DA BOMBA DE PRÓTONS NA SENSIBILIDADE
IN VITRO E INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE MELANINA EM *Cryptococcus spp.***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha.

Área de concentração: Ciências biológicas III.

Linha de pesquisa: Resistência à antimicrobianos.

FORTALEZA-CE

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- Ele Espanha, Jaime David Acosta.
Efeito dos inibidores da bomba de prótons na sensibilidade *in vitro* e inibição da produção de melanina em *Cryptococcus* spp. / Jaime David Acosta España. – 2017.
95 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2017.
Orientação: Profª. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.
Coorientação: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha.
1. Melanina. 2. *Cryptococcus*. 3. *Criptococose*. 4. Inibição da Melanogênese. I. Título.
- CDD 616.9
-

JAIME DAVID ACOSTA ESPAÑA

**EFEITO DOS INIBIDORES DA BOMBA DE PRÓTONS NA SENSIBILIDADE
IN VITRO E INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE MELANINA EM *Cryptococcus* spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha.

Área de concentração: Ciências biológicas III.

Linha de pesquisa: Resistência à antimicrobianos.

Aprovada em: 03/08/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Flavia Almeida Santos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha.
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

AGRADECIMENTOS

A zona de conforto pode limitar nosso potencial, muitas vezes o medo para o nosso progresso, mas não é corajosa uma pessoa sem medo, porque o medo é parte natural da humanidade. Mas as pessoas podem lutar pelos ideais mesmo com medo. Por isso, sou incomensuravelmente grato aos meus pais, Gustavo Acosta e Carmen España, por seus esforços constantes em minha formação, além dos valores, a perseverança, eu aprendi deles a lutar por meus objetivos enfrentando meus medos. Sair do país de origem é um desafio complexo, mas, com ajuda e motivação de meus irmãos e irmã, consegui o impulso para um desafio científico e de formação pessoal chamado mestrado. Agradeço também à mulher que roubou meu coração, Jenny Belen Altamirano, e sua família por todo o apoio durante este período de tempo longe das pessoas que amo.

À Professora Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante por ter me aceito no programa de microbiologia médica, por ser minha orientadora, apesar das dificuldades de linguagem iniciais, e que, pacientemente, me guiou ao longo do mestrado. Lembro-me de cada conversa científica com o Professor Marcos Fábio Gadelha Rocha que, com a sua organização e disciplina, colaborou de várias formas, especialmente na escrita do primeiro artigo publicado, produto deste trabalho.

Aos demais professores que compõem o Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) desta Instituição: Prof. José Júlio Costa Sidrim, Prof^a. Rossana de Aguiar Cordeiro e Prof^a. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia, que sempre se dispuseram a me auxiliar na realização desse trabalho.

Aos professores que compuseram as bancas de qualificação e defesa dessa dissertação, contribuindo significativamente com suas sugestões para o engrandecimento desse trabalho.

É bom conhecer profissionais de qualidade, pois quando cheguei a Fortaleza, os discentes do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica não só me ajudaram na parte acadêmica e científica, mas se tornaram minha nova família no Brasil. Eles colaboraram com minha formação e adaptação, eram meus tradutores oficiais em cada sala de aula, ajudaram-me a encontrar um lugar para morar e me

mostraram a maravilhosa cultura Cearense e Brasileira. Muito obrigado: Dr. Lucas Alencar, Jonathas Sales, Gláucia Guedes, Jamille Alencar, Dra. Silviane Praciano, Antônio Evangelista, Kleybson Sousa, Livia Galdino, Gleiciane Rocha, Dra. Rosana Serpa, Ana Luiza Aguiar, Jamilla Alexandrino, Christer Ocadaque, Ewerton Caracas, Edimilson Correa, Vandbergue Santos, Jonathas Franco, Fernando Monteiro.

Aos funcionários dessa Instituição, em especial os técnicos de laboratório, Terezinha Rodrigues e Gláucia Guedes, e a secretária Carolinda Soares.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Organização dos Estados Americanos (OEA) pela concessão da bolsa, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento dessa pesquisa.

A todos vocês, muitíssimo obrigado!

“O que sabemos é uma gota de água; o que ignoramos é o oceano”.

Isaac Newton

“A verdade na ciência pode ser um estado momentâneo e apenas uma busca contínua do conhecimento nos ajudará a entender o que realmente acontece. A natureza nos oferece as respostas, mas provavelmente na atualidade não temos ferramentas ou conhecimento suficiente para entender seus processos”.

Jaime Acosta

RESUMO

Cryptococcus neoformans lato sensu e *Cryptococcus gattii lato sensu* são leveduras hialinas capazes de produzir melanina, estando associados a uma doença chamada criptococose. Para sua instalação e disseminação, vários fatores de virulência têm sido associados, como a produção de melanina, que é produzida por uma fenoloxidase chamada lacase que oxida os compostos fenólicos. Estudos demonstraram que os inibidores de bomba de prótons (IBP's) têm efeitos inibitórios na produção de melanina, em melanócitos, produzidos por uma fenoloxidase chamada tirosinase. Este efeito inibitório da melanogênese foi associado ao bloqueio da tirosinase. Uma vez que os melanócitos e *Cryptococcus* spp. produzem melanina por uma via semelhante à oxidação de compostos fenólicos, o objetivo deste trabalho foi testar o efeito de IBP's na inibição de produção de melanina em *C. neoformans/C. gattii lato sensu*. Para tanto, inicialmente foi desenvolvida uma nova metodologia para quantificação de melanina por meio da escala de cinza. Neste sentido, foram analisadas 12 cepas de *Cryptococcus* spp., uma cepa de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (controle negativo) e uma cepa de *Hortaea werneckii* (controle positivo), resultando em uma adequada produção e quantificação de melanina nas cepas testadas. A seguir, foram testados os IBP's (omeprazol, rabeprazol, lansoprazol, esomeprazol e pantoprazol), os antifúngicos clássicos (fluconazol e anfotericina B) e glifosato (inibidor da melanogênese em *Cryptococcus* spp.) sobre a sensibilidade de 20 cepas de *Cryptococcus* spp. e uma cepa de *C. parapsilosis* ATCC 22019, baseado no documento M27-A3 do *Clinical Laboratory Standart Institute* (CLSI). Foram observados os seguintes valores de MIC50: para omeprazol $166,7 \pm 91,29 \mu\text{g/mL}$; esomeprazol $256 \pm 115,1 \mu\text{g/mL}$; lansoprazol $226 \pm 200,1 \mu\text{g/mL}$; rabeprazol $142,6 \pm 74,6 \mu\text{g/mL}$; pantoprazol $428,6 \pm 297,3 \mu\text{g/mL}$; glifosato $952,4 \pm 150,4 \mu\text{g/mL}$; fluconazol $4,757 \pm 1,6 \mu\text{g/mL}$ e; anfotericina B $1,464 \pm 2,6 \mu\text{g/mL}$. Finalmente, foram testadas concentrações subinibitórias dos IBP's sobre a produção de melanina em *Cryptococcus* spp., obtendo como resultado uma inibição da melanina para os inibidores de bomba de prótons, sendo o melhor efeito obtido com omeprazol, lansoprazol e pantoprazol. Portanto, IBP's têm um efeito importante na inibição de melanina em *Cryptococcus* spp., sendo necessário estudos mais aprofundados para compreender os mecanismos de inibição e seu possível potencial na diminuição de virulência, disseminação e infecção do SNC.

Palavras-chave: Melanina; *Cryptococcus*; Criptococose; Inibição da Melanogênese

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans sensu lato and *Cryptococcus gattii* sensu lato are hyaline yeasts capable of producing melanin, being associated with a condition called cryptococcosis. For installation and its spread, several virulence factors have been associated, such as melanin production, which is produced by phenoloxidase called laccase, which oxidizes phenolic compounds. Studies have shown that proton pump inhibitors (PPI's) have an inhibitory effect on melanin production, in melanocytes, produced by a phenoloxidase, called tyrosinase. This effect on inhibition of melanogenesis was associated with inhibition of tyrosinase. Since melanocytes and *Cryptococcus* spp. produce the melanin with a similar oxidation action of phenolic compounds, the objective of this work was to test the effect of PPI's on the inhibition of melanin production in *Cryptococcus neoformans/gattii* lato sensu. For this, a new methodology was initially developed for the quantification of melanin, through the gray scale. In this experiment, 12 strains of *Cryptococcus* spp., 1 strain of *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (negative control) and 1 strain of *Hortaea werneckii* (positive control) were analyzed, resulting in an adequate production and quantification of melanin in tested strains. Next, PPIs were tested (omeprazole, rabeprazole, lansoprazole, esomeprazole and pantoprazole), classical antifungal agents (fluconazole and amphotericin B) and glyphosate (inhibitor of melanogenesis in *Cryptococcus* spp.) on the susceptibility of 20 strains of *Cryptococcus* spp. and 1 strain of *C. parapsilosis* ATCC 22019, based on the protocol M27-A3 of the Clinical Laboratory Standart Institute (CLSI). The following MIC50 values were observed: for omeprazole 166.7 ± 91.29 $\mu\text{g/ml}$, esomeprazole 256 ± 115.1 $\mu\text{g/ml}$, lansoprazole 226 ± 200.1 $\mu\text{g/ml}$, rabeprazole 142.6 ± 74.6 $\mu\text{g/ml}$, pantoprazole 428.6 ± 297.3 $\mu\text{g/ml}$, glyphosate 952.4 ± 150.4 $\mu\text{g/ml}$, fluconazole $4,757 \pm 1,6$ $\mu\text{g/ml}$ and amphotericin B $1,464 \pm 2.6$ $\mu\text{g/ml}$. Finally, subinhibitory concentrations of PPIs were tested on melanin production in *Cryptococcus* spp., resulting in an inhibition of melanin for protons pump inhibitors, the best effect being obtained with omeprazole, lansoprazole and pantoprazole. Therefore, PPI's has an important effect on the inhibition of melanin in *Cryptococcus* spp., and further studies are needed to understand the mechanisms of inhibition and its potential in reducing virulence, dissemination and infection of the CNS.

Keywords: Melanin. *Cryptococcus*. Cryptococcosis. Inhibition of Melanogenesis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Taxonomia gênero <i>Cryptococcus</i>	6
Figura 2 - Reconhecimento de sete espécies no complexo de espécies <i>Cryptococcus gattii</i> / <i>Cryptococcus neoformans</i>	8
Figura 3 - Aspectos morfofisiológicos do gênero <i>Cryptococcus</i>	10
Figura 4 - Comparação entre fungo demáceo e melanizado	20
Figura 5 - Reação de produção de melanina em melanócitos	25
Figura 6 - Epidemiologia global da meningite criptocócica relacionada ao HIV/aids ano 2009	27
Figura 7 - Distribuição das formas clínicas de criptococose.....	29
Figura 8 - Principais etapas da patogênese da criptococose.....	32
Figura 9 - Organograma das principais etapas experimentais do estudo.	44
Figura 10 - Doses subinibitórias utilizadas no experimento qualitativo e quantitativo de inibição da melanogênese.....	48
Figura 11 - Gráficos comparativos da sensibilidade em 20 cepas de <i>Cryptococcus</i>	54
Figura 12 - Análise da produção de melanina em cepas <i>Cryptococcus neoformans</i> / <i>C. gattii lato sensu</i>	51
Figura 13 - Experimento qualitativo da inibição da produção de melanina com omeprazol, foram testadas 11 cepas de <i>Cryptococcus</i> e uma cepa de <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019.	57
Figura 14 - Experimento quantitativo da inibição da produção de melanina.....	59

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1 - Sinais e sintomas associados à meningoencefalite	33
Tabela 2 - Sinais e sintomas associados criptococose pulmonar.....	34
Tabela 3 - Comparação para testes de susceptibilidade por microdiluição	37
Tabela 6 - Produção de melanina por <i>Cryptococcus</i> spp. (N = 12) em ágar médio mínimo sem e com L-DOPA do terceiro até o sétimo dia de crescimento	50
Tabela 4 - Sensibilidade para as 20 cepas de <i>Cryptococcus</i>	53
Tabela 5 - Sensibilidade para <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019.....	55
Tabela 7 - Experimento de inibição da melanogênese	58
Quadro 1 - Identificação, espécie, genótipo, fenótipo e origem de isolamento das cepas de <i>Cryptococcus</i> spp. e <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	42

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AMB	Anfotericina B
AFLP	<i>Amplified fragment length polymorphism</i>
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATF	Antifúngicos
CD4	Linhagem de linfócitos
CGB	Meio Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
CrAg	Antígenos capsulares de <i>Cryptococcus</i>
DHN	1,8-dihidroxi-naftaleno
DRGE	Doença do refluxo gastroesofágico
DMSO	Dimetilsulfóxido
EIA	<i>Enzyme Immunoassay</i>
EPM	<i>Extracellular Polymeric Matrix</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
EPR	<i>Electron paramagnetic resonance</i>
FCZ	Fluconazol
GXM	Glucuronoxilomanana
GalXM	Galactoxilomanana
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IARC	<i>The International Agency for Research on Cancer/OMS</i>
IBP	Inibidores da bomba de prótons
l-DOPA	L-3,4- dihidroxifenilalanina
LFA	<i>Lateral flux assay</i>
MOPS	Ácido 3- (N-morfolino) propanossulfônico
MIC	<i>Minimal Inhibitory Concentration</i>
NH ₃	Amônia
NSA	Ágar semente de níger
OMS	Organização Mundial de Saúde

<i>PLBI</i>	Gene da fosfolipase 1
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PUD	<i>Peptic Ulcer Disease</i>
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SNC	Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Panorama histórico	3
2.2 Gênero <i>Cryptococcus</i> e taxonomia	5
2.3 Aspectos morfofisiológicos e diagnósticos.....	9
2.3.1 Diagnóstico da criptococose.....	11
2.4 Fatores de virulência.....	13
2.4.1 Cápsula.....	14
2.4.2 Termotolerância a 37 °C	15
2.4.3 Produção de enzimas.....	16
2.4.4 Biofilme	18
2.4.5 Melanina: sua identificação e quantificação.....	19
2.4.5.1 Inibidores da bomba de prótons na inibição de melanina.....	24
2.5 Criptococose: epidemiologia, ecologia, patogenia, principais formas clínicas.....	26
2.6 Tratamento da criptococose e sensibilidade aos antifúngicos em cepas de <i>Cryptococcus spp.</i>	34
3 HIPÓTESES	39
4 OBJETIVOS	40
4.1 Objetivo geral	40
4.2 Objetivos específicos.	40
5 MATERIAL E METODOS.....	41
5.1 Local do estudo.....	41
5.2 Microrganismos utilizados.	41
5.2 Desenho experimental.....	42
5.3.1 Método alternativo para a análise da produção de melanina em cepas de <i>Cryptococcus neoformans lato sensu</i> e <i>Cryptococcus gattii lato sensu</i>	44
5.3.2 Sensibilidade em células planctônicas de <i>Cryptococcus spp.</i>	46
5.3.3 Inibição da melanogênese em cepas de <i>Cryptococcus neoformans lato sensu</i> e <i>Cryptococcus gattii lato sensu</i>	47
5.4 Testes estatísticos.....	48
6 RESULTADOS.....	49
6.1 Método alternativo para a análise da produção de melanina em cepas de <i>Cryptococcus neoformans lato sensu</i> e <i>Cryptococcus gattii lato sensu</i>	49
6.2 Sensibilidade em células planctônicas de <i>Cryptococcus spp.</i>	52

6.3 Inibição da melanogênese em cepas de <i>Cryptococcus neoformans lato sensu</i> e <i>Cryptococcus gattii lato sensu</i>	56
7 DISCUSSÃO	60
8 CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	66
ANEXO B	81

1. INTRODUÇÃO

A prevalência de doenças fúngicas oportunistas tem aumentado especialmente em pacientes com doenças que comprometem o sistema imune. Em geral, os fungos causadores de infecções oportunistas não causam doença em seres humanos, mas, em algumas situações, podem desenvolver patologias com alta taxa de mortalidade. Neste grupo de patógenos oportunistas, podemos encontrar fungos dimórficos, fungos filamentosos e leveduras (BADIEE; HASHEMIZADEH, 2014; HILARY et al., 2017).

Dentre os fungos dimórficos mais prevalentes, estão os dos gêneros *Histoplasma* e *Coccidioides*. Os principais fungos filamentosos associados a estas patologias são dos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium*. Por sua vez, as leveduras que estão vinculadas a doenças sistêmicas oportunistas são as espécies de *Cryptococcus* e de *Candida*. Esta prevalência depende da região e de suas particularidades (BADIEE; HASHEMIZADEH, 2014; HILARY et al., 2017).

Desta ampla gama de patógenos, chama a nossa atenção a levedura do gênero *Cryptococcus*, cuja alta prevalência deste fungo acomete pacientes imunocomprometidos, principalmente aquelas pessoas infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e síndrome de imunodeficiência adquirida (Aids). Provavelmente, um deficit na imunidade celular pode aumentar o risco de desenvolver estas doenças por fungos oportunistas (BADIEE; HASHEMIZADEH, 2014; CALDERÓN; IBAÑEZ; HERNÁNDEZ, 2009).

Desde a década de 1980, foi observado um aumento dos pacientes com HIV/Aids cujas infecções estão relacionadas aos fungos oportunistas. *Cryptococcus* spp. é o principal agente associado a infecções no sistema nervoso central (SNC) para este grupo de pacientes. Um estudo de prevalência realizado por Park et al. (2009) evidenciou que cerca de 957.900 casos de meningoencefalite criptocócica ocorriam, a cada ano, em todo o mundo, resultando em 624.700 mortes anualmente. O continente americano ocupa o terceiro lugar por número de casos (Park et al., 2009). No estudo mais atual de Rajasingham et al., (2017), estimam-se 223.100 casos por ano, com cerca de 181.100 mortes por ano, sendo essa diminuição na prevalência explicada por conta da terapia antirretroviral. No Brasil, a criptococose ocorre como primeira manifestação oportunista em cerca de 4,4% dos casos de HIV/Aids (BADIEE; HASHEMIZADEH,

2014; CALDERÓN; IBAÑEZ; HERNÁNDEZ, 2009; GRUPO DE CONSENSO DE CRIPTOCOCOSE, 2008; PARK et al., 2009; RAJASINGHAM et al., 2017).

Criptococose é o termo utilizado para definir a doença causada por *Cryptococcus* spp. Esta doença é adquirida pela inalação de leveduras que podem estar presentes no ar de solos contaminados. *Cryptococcus neoformans lato sensu* é cosmopolita, encontrado principalmente em solos contaminados com fezes de aves, especialmente pombos; enquanto *Cryptococcus gatti lato sensu* tem sido associada a madeira em decomposição (DIXIT; CARROLL; QURESHI, 2009; HAGEN et al., 2015; SPINA-TENSINI et al., 2017; TAYLOR-SMITH; MAY, 2016; WILLIAMSON et al., 2016).

Existe uma vasta variedade de formas clínicas da criptococose, sendo a infecção do SNC a mais predominante, que gera uma infecção e inflamação do tecido cerebral e meníngeo chamado meningoencefalite. Para desenvolver estas patologias, as espécies do gênero *Cryptococcus* têm um arsenal conhecido como fatores de virulência (GRUPO DE CONSENSO DE CRIPTOCOCOSE, 2008; MAY et al., 2015; PERDIGÃO-NETO, 2011; WILLIAMSON et al., 2016). Estes fatores de virulência são cruciais para o processo infeccioso, evasão do sistema imune, sobrevivência e disseminação do micro-organismo. Dentro desta gama de fatores, são descritos: a produção de cápsula, a produção de melanina, termotolerância, a produção de enzimas, resistência antifúngica e desenvolvimento de biofilme. Dois fatores de virulência são fundamentais, já que cepas mutantes, sem produção de cápsula e melanina, são avirulentas. Melanina é um fator de virulência, que dá uma pigmentação castanha a esta levedura, e está associada à evasão do sistema imune e disseminação para o SNC (ALSPAUGH, 2016; FISHER; VALENCIA-REY; DAVIS, 2016; TAYLOR-SMITH; MAY, 2016).

Considerando que a melanina é um dos fatores mais importantes na patogênese de cepas de *Cryptococcus* spp., sua inibição representa uma estratégia-chave importante a ser investigada. Nesta perspectiva, os inibidores de bomba de prótons, comumente usados na prática clínica humana para o controle da acidez estomacal, podem ser uma opção promissora, haja vista seu efeito inibitório sobre a síntese de melanina em células eucarióticas. Em estudos com melanócitos, os inibidores da bomba de prótons impediram a melanogênese em ratos e em modelos de cultura celular, por meio da obstrução da tirosinase, que se trata de uma fenoloxidase associada à produção de melanina em melanócitos (BAEK; LEE, 2015; MATSUI et al., 2015). Vale destacar que

o *Cryptococcus* spp. também tem uma enzima com atividade fenoloxidase, conhecida como lacase, associada à produção de melanina fúngica (EISENMAN et al., 2007; ERB-DOWNWARD et al., 2008; SALAS et al., 1996; SÁNCHEZ-FERRER et al., 1995; SINGHAL; CHOUDHARY; THAKUR, 2012). Por conseguinte, este estudo avaliou o efeito dos inibidores da bomba de prótons (omeprazol, rabeprazol, lansoprazol, esomeprazol e pantoprazol) na sensibilidade, *in vitro*, assim como a inibição da produção de melanina em *Cryptococcus* spp.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Panorama histórico

O agente patogênico, atualmente conhecido como *Cryptococcus neoformans*, foi descrito em 1884 e apresentou vários nomes e sinônimos por meio da história. O primeiro isolamento, realizado em 1884, foi descrito por Francesco Sanfelice em sumo de pêssogo. No mesmo ano, o patologista Otto Busse e o cirurgião Abraham Buschke também a descreveram numa paciente do sexo feminino, de 31 anos, com lesão na tíbia, que era semelhante a um sarcoma (DEEPA. SRIKANTA, FELIPE H. SANTIAGO-TIRADO, 2014).

Busse (1885), ao nomear a doença *Saccharomycosis hominis* (DEEPA. SRIKANTA, FELIPE H. SANTIAGO-TIRADO, 2014), chamou o fungo *Saccharomyces*, enquanto que Sanfelice denominou como *Saccharomyces neoformans*, embora a formação de ascósporo, que caracteriza o gênero *Saccharomyces* e *Cryptococcus neoformans*, não produza ascósporos (DEEPA. SRIKANTA, FELIPE H. SANTIAGO-TIRADO, 2014).

A partir do ano de 1900, ocorreram vários relatos clínicos de leveduras semelhantes a *C. neoformans*, que, até 1901, eram denominados de *Saccharomyces* e *Cryptococcus*. Jean-Paul Vuillemin, em 1901, chamou a levedura de Busse de *Cryptococcus hominis* e também renomeou a levedura de Sanfelice como *Cryptococcus neoformans*, pois a levedura não formou ascósporos em seus estudos desenvolvidos na Universidade de Nancy, na França (BARNETT, 2010). Mais tarde, adaptou outros nomes, como *Torula klein*, *Torula neoformans*, *Torula plimmeri*, descritos por Weis em 1902.

Beurmann e Gougerot, em 1909, descrevem um microrganismo chamado *Atelosaccharomyces busse-buschke*, que apresenta todas as características de

Saccharomyces spp., com exceção do ascósporo (BARNETT, 2010). Já em 1916, Stoddard e Cutler relataram, em seus estudos, o patógeno *Torula histolytica* como sendo responsável pela infecção sistêmica e destruição do tecido, com descrição de uma cápsula produzida pelo microrganismo (BARNETT, 2010).

Mais de 20 anos depois, em 1934 e 1935, Rhoda Benham, da Universidade de Columbia em Nova York, apontou que muitas leveduras, até então conhecidas por diferentes nomes, pertenciam à mesma espécie (BENHAM, 1935). Eventualmente, em 1950, Benham denominou, com sucesso, a adoção de '*Cryptococcus neoformans*' de Vuillemin como o nome autêntico (BENHAM, 1950).

Rhoda Benham, em 1950, baseando-se em observações dos aspectos morfofisiológicos, patogênicos e sorológicos dos isolados, concluiu que estes dados poderiam ser classificados como uma única espécie, *Cryptococcus neoformans*, porém, apresentando duas variedades, *neoformans* e *grubii*. Relatou ainda a doença produzida como criptococose. A doença causada por este fungo era conhecida como blastomicose europeia em casos com envolvimento subcutâneo ou visceral. Benham desconsidera o termo blastomicose, usado desde 1920 para descrever as infecções causadas por diferentes gêneros, e emprega: *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Monilia*, *Oidium* e *Coccidioides*. Criptococose abrange ainda o termo torula meningite, que foi usado para definir infecções do sistema nervoso central e de outros órgãos, exceto as referentes à pele (BENHAM, 1950).

Lodder e Kreger-van Rij, em 1952, no primeiro estudo taxonômico importante de todas as leveduras conhecidas sob o título "The Yeasts. A Taxonomic Study" (LODDER; KREGER-VAN RIJ, 1952) reconhece as recomendações de Rhoda Benham. Assim, padronizando a nomenclatura deste organismo, foram pelo menos descritos 49 sinônimos para esta espécie (BARNETT, 2010).

Edwards et al. (1967) publicaram um minucioso estudo micrográfico eletrônico das células de *C. neoformans*, ilustrando a cápsula, parede celular, membrana plasmática, núcleo, nucléolo, membrana nuclear, vacúolos, retículo endoplasmático, mitocôndrias e ribossomos (EDWARDS et al., 1967). Edwards et al., usando testes de aglutinação em tubos, encontraram três sorotipos, A, B e C, com base nas diferenças antigênicas no polissacarídeo capsular (EVANS, 1950). Porém, após quase 21 anos da descoberta inicial de Evans, um grupo de pesquisadores, do Instituto Nacional de Saúde,

em Bethesda, demonstrou um quarto sorotipo, o tipo D (WILSON; BENNETT; BAILEY, 1968).

Além da importância na classificação dos sorotipos, a formação de cápsula desempenha um papel significativo na patogenicidade de *C. neoformans*. Chang e colaboradores, em 1994, relatam que cepas mutantes deficientes, na produção de cápsulas, eram marcadamente menos virulentas do que cepas do tipo selvagem (CHANG; KWON-CHUNG, 1994). Zaragoza e colaboradores (2009) descreveram que os componentes capsulares são determinantes na virulência: (A) glucuronoxilomanana (GXM), 90% da cápsula; (B) galactoxilomanana (GalXM), que tem importantes propriedades imunológicas; e (C) manoproteína (ZARAGOZA et al., 2010). Um estudo melhor da cápsula será abordado na seção fatores de virulência

Outro fator importante na patogênese e identificação foi descrito em 1962 por Friedrich Staib, o qual observou colônias castanhas de *C. neoformans* no meio feito com substrato aquoso de sementes de *Guizotia abyssinica* (semente de níger) (STAIB, 1962). Staib revela que esta propriedade foi observada apenas para *C. neoformans* e poderia ser utilizada para diferenciá-lo dos outros membros deste gênero. Staib também desenvolveu um meio que incorpora esses extratos de semente que sofreram muitas mudanças de nome ao longo dos anos, a partir de "ágar *Guizotia abyssinica* creatinina", "ágar de semente de pássaro", "ágar de semente de Níger" e, finalmente, "ágar Staib" (POLACHEK, 1991).

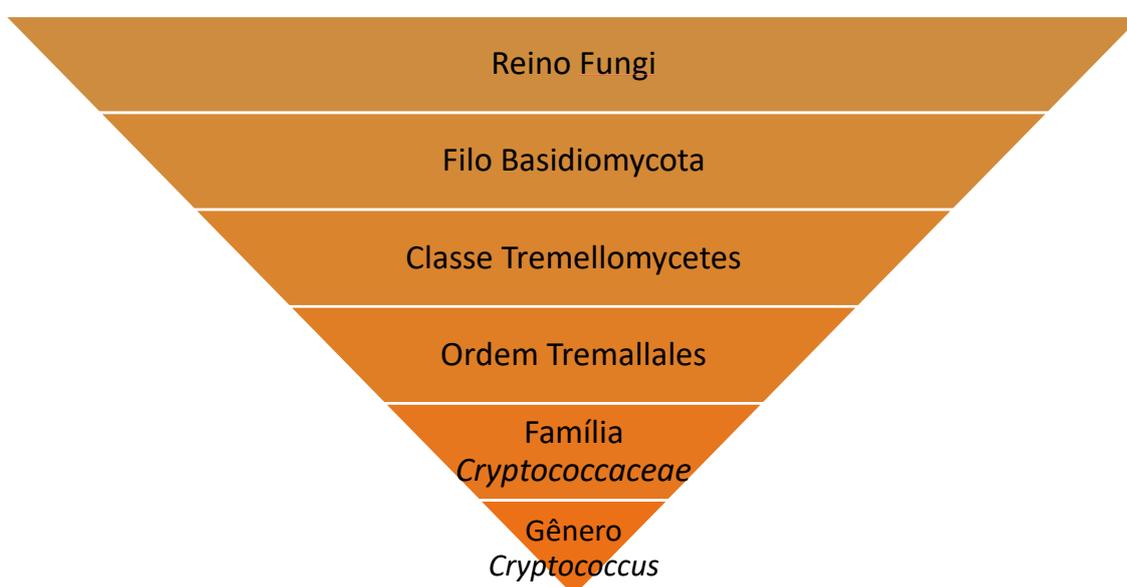
Em 1970, Gattii e Eeckels descreveram um caso de meningoencefalite em uma criança de sete anos. Na ocasião, os pesquisadores relataram que o isolado se assemelhava com *C. neoformans*, no entanto tinha morfologia atípica, apresentando-se como leveduras alongadas, sendo considerado uma nova variedade denominada de *C. neoformans* var. *gattii* (GATTI, F; EECKELS, 1970).

2.2 Gênero *Cryptococcus* e taxonomia

Segundo Taxonomy Browser, do Centro Nacional para Informação Biotecnológica dos Estados Unidos, o gênero *Cryptococcus* forma parte do Reino Fungi, Filo Basidiomycota, Classe Tremellomycetes, Ordem Tremallales, Família *Cryptococcaceae* (Figura 1).

Cryptococcus é um gênero dentro do Tremellales, uma ordem de fungos que é comumente encontrada crescendo em madeira em decomposição como saprófitos. Mais de 100 espécies de *Cryptococcus* são conhecidas, duas destas espécies, *C. neoformans* e *C. gattii*, causam a maioria das infecções humanas. Ambas espécies podem ser facilmente extraídas do ambiente: elas podem ser isoladas da casca de uma grande variedade de espécies arbóreas e de outras matérias orgânicas, como fezes de aves (WILLIAMSON et al., 2016).

Figura 1 - Taxonomia do gênero *Cryptococcus*



Adaptado por (ACOSTA. 2017) de *Taxonomy Browser*, NCBI, USA, Ano: 2017.

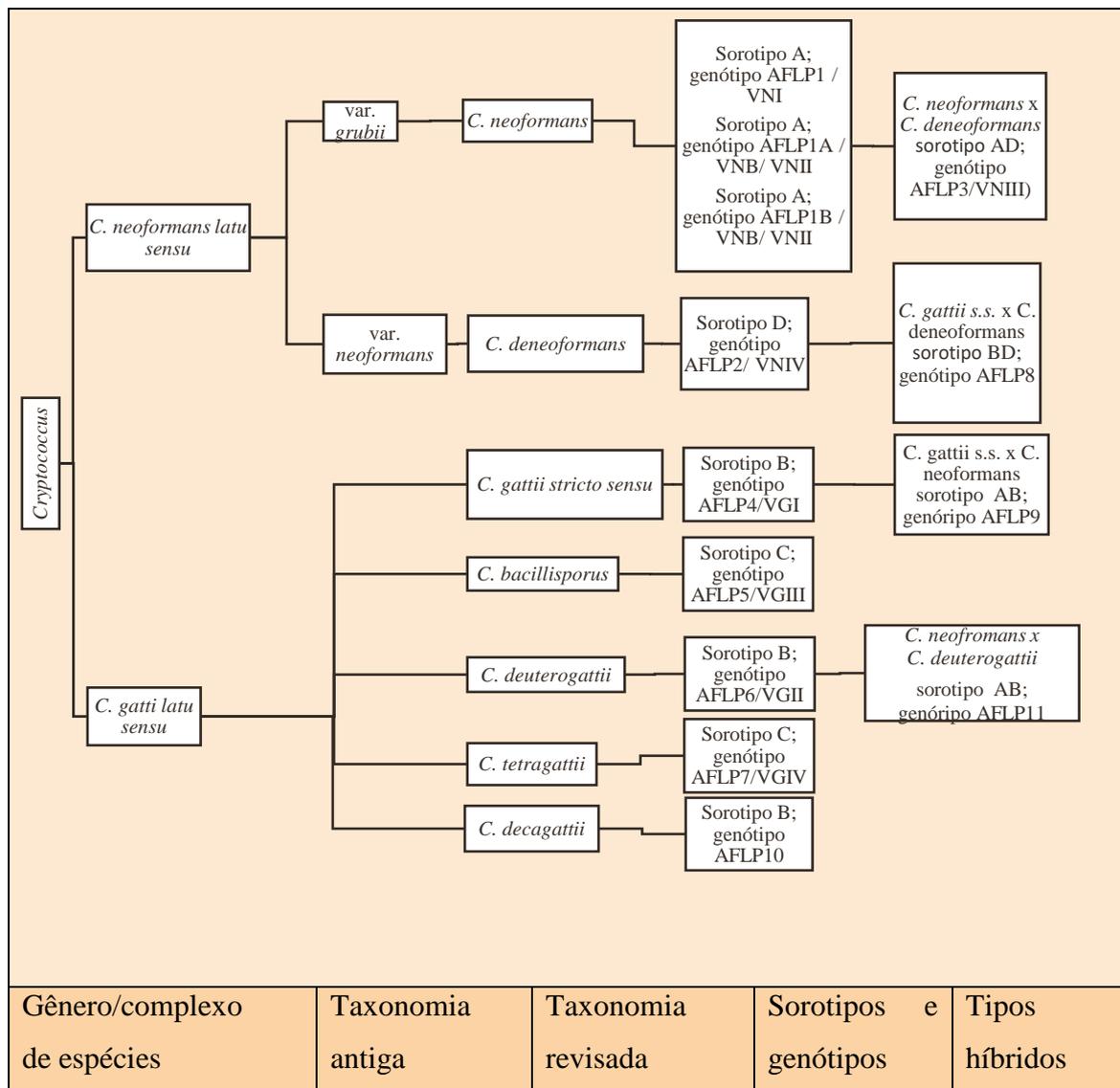
A Família *Cryptococcaceae* e o gênero *Cryptococcus* passaram por uma atualização taxonômica no ano de 2015, com base na classificação filogenética (LIU et al., 2015). De fato, foram atualizados a família e o gênero, antigamente *Tremallaceae* e *Filobasidiella* respectivamente.

Como resultado da reunião de Torino, em 2007, o grupo de trabalho reconheceu que os diferentes métodos de genotipagem utilizados pelos diferentes grupos de pesquisa levam os principais genótipos correspondentes para os agentes da criptococose (MEYER et al., 2009). Duas metodologias têm maior relevância na genotipagem de *Cryptococcus* spp.. Meyer e colaboradores usam impressões digitais por PCR, utilizando primers específicos para microsátélites (M13) (MEYER et al., 1999, 2003),

enquanto que Boekhout e colaboradores usam Polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP) (BOEKHOUT et al., 2001). Na Figura 1, mostra-se a correlação entre as duas metodologias de genotipagem molecular para *Cryptococcus* spp.

Dentro do gênero *Cryptococcus*, foi descrito o complexo *C. neoformans/C. gattii*, mas, atualmente, diferenças consideráveis foram documentadas entre o complexo de *C. neoformans*, de um lado, e o complexo *C. gattii* (HAGEN et al., 2015), do outro. Com base na diversidade fenotípica e genotípica entre *C. gattii/C. neoformans*, o complexo foi dividido em sete genótipos haploides e quatro híbridos. Dessa forma, o *Cryptococcus gattii lato sensu* foi separado em cinco espécies; *C. gattii stricto sensu* (sorotipo B, genótipo AFLP4 / VGI), *C. bacillisporus* (sorotipo C, genótipo AFLP5 / VGIII), *C. deuterogattii* (sorotipo B, genótipo AFLP6 / VGII), *C. tetragattii* (sorotipo C, genótipo AFLP7 / VGIV) e *C. decagattii* (serotipo B, genótipo AFLP10). *Cryptococcus neoformans lato sensu*, por sua vez, atualmente compreende as espécies *C. neoformans stricto sensu* (antiga var. *grubii*; AFLP1 / VNI, AFLP1A/VNB / VNII) e *C. deneoformans* (antiga var. *neoformans*; AFLP2 / VNIV) (Figura 2).

Figura 2 - Reconhecimento de sete espécies no complexo *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans*



Fonte: (Acosta, 2017). Atualização de espécies adaptadas de HAGEN et al., 2015; genótipos adaptados de MEYER et al., 1999, 2003; e BOEKHOUT et al., 2001; os sorotipos foram adaptados de Evans, 1950 e; Bennet, 1968.

2.3 Aspectos morfofisiológicos e diagnósticos.

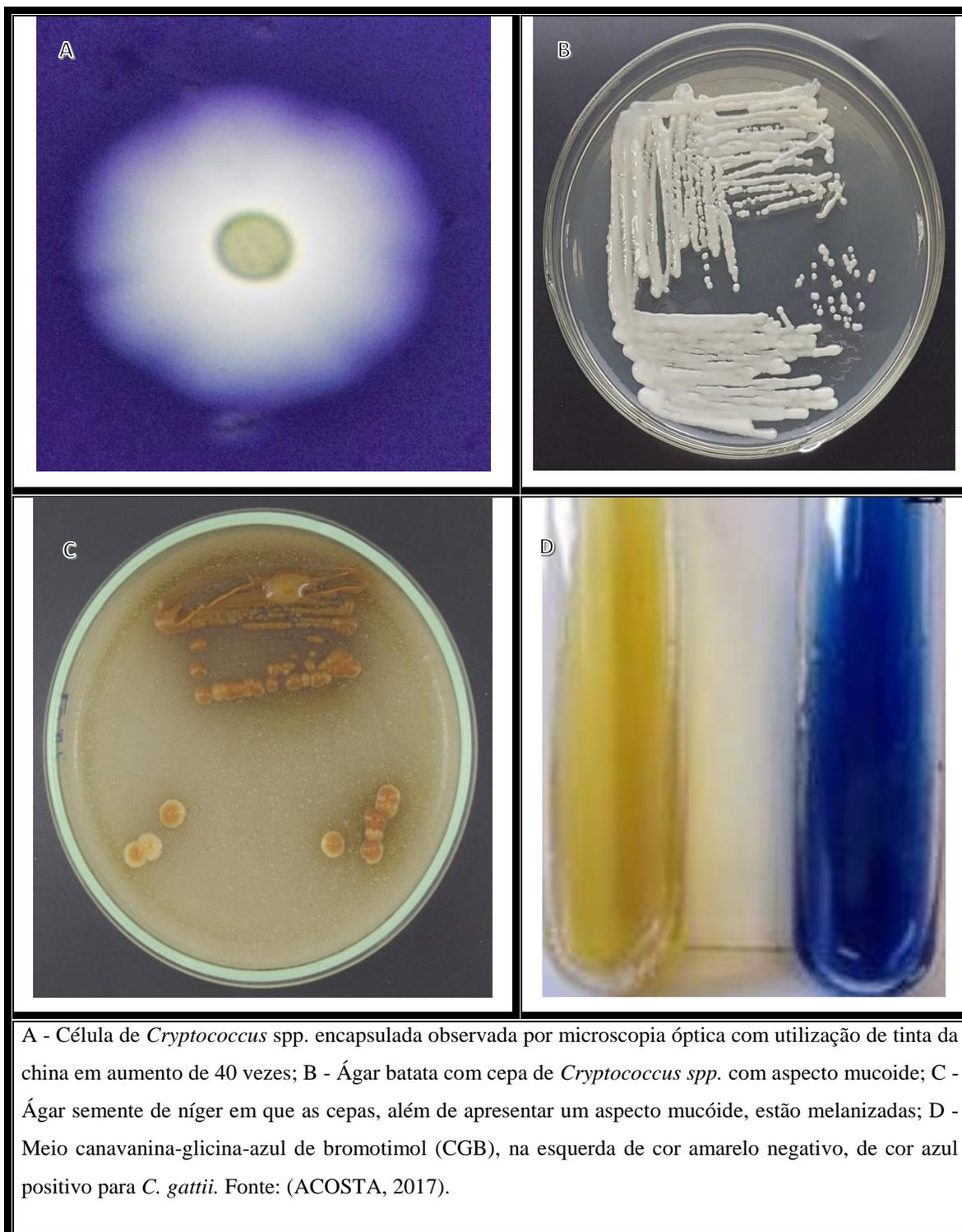
O gênero *Cryptococcus* macro, morfológicamente em ágar batata e Sabouraud, é visualizado a olho nu. As colônias apresentam a cor branca, quando estão recentemente semeadas, até cremes em cepas mais velhas, com uma textura mucóide (Figura 3B), sendo esta uma diferença das cepas de *Candida* spp., que é uma levedura frequente na clínica humana.

O ágar semente de níger (NSA), ágar l-DOPA e ágar cafeico são muito importantes na identificação do gênero *Cryptococcus*, já que, em base aos compostos fenólicos presentes nestes meios, se criam as condições ideais para a produção de melanina a partir da enzima lacase. As cepas de *Cryptococcus* spp., semeadas em NSA, têm aspecto mucoide, de cor castanho, dado pela produção de melanina (Figura 3C) (JOSEPH HEITMAN, THOMAS R. KOZEL, KYUNG J. KWON-CHUNG, JOHN R. PERFECT, 2011).

O meio l-canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) existe, além dos meios para estimular a produção de melanina, com a finalidade de ajudar na diferenciação entre *Cryptococcus gattii* *latu sensu*, que usa a glicina como única fonte de carbono, e nitrogênio. Enquanto que l-canavanina atua como um fármaco inibindo o crescimento de *C. neoformans*. Destes, 60% das cepas de *C. neoformans* sorotipo A são resistentes a L-canavanina, mas não conseguem assimilar glicina presente no meio. Assim, o crescimento de 100% das cepas pertencentes ao *C. neoformans* é inibida e, finalmente, as cepas de *Cryptococcus gattii* apresentam cor azul no meio CGB (Figura 3D) (JOSEPH HEITMAN, THOMAS R. KOZEL, KYUNG J. KWON-CHUNG, JOHN R. PERFECT, 2011; PÉREZ et al., 2003).

Por microscopia óptica, apresenta leveduras esféricas ou ovaladas, medindo cerca de 4µm a 10µm de diâmetro. Para a observação da cápsula, é necessária uma coloração negativa como a nigrosina (Tinta da china, Tinta Parker, Tinta Ink) (Figura 3A), que deixa o fundo de preto, e a levedura fica refringente, já que este corante não consegue penetrar no microorganismo por conta da cápsula, sendo observada a levedura com um halo, podendo chegar até 80µm de diâmetro (JOSEPH HEITMAN, THOMAS R. KOZEL, KYUNG J. KWON-CHUNG, JOHN R. PERFECT, 2011).

Figura 3 - 3. Aspectos morfofisiológicos do gênero *Cryptococcus*.



As células são haploides e se reproduzem por brotamento simples ou múltiplo, sem apresentar hifas ou pseudo-hifas. Por serem basidiomicetos heterotálicos e possuírem sistema *mating* bipolar (*MATa* e *MAT α*) que regula o ciclo sexual, podem apresentar fase filamentosa, geralmente sob condições laboratoriais. A partir da fusão entre células haploides *MATa* e *MAT α* , origina-se uma hifa dicariótica que, depois de sofrer meiose, dá origem aos basidiósporos haplóides, em sua maioria do tipo *MAT α* , sendo considerado mais virulento do que o tipo *MATa* (JOSEPH HEITMAN, THOMAS R. KOZEL, KYUNG J. KWON-CHUNG, JOHN R. PERFECT, 2011).

2.3.1 Diagnóstico da criptococose

O diagnóstico em pacientes com suspeita de criptococose depende do sítio da infecção, que pode incluir: lesões cutâneas com estudo de biópsia das lesões; amostra de sangue periférica para diagnóstico sorológico, obtido por punção lombar no caso de suspeita de infecção cerebral; amostras de urina e de escarro são recomendados, mesmo que a doença renal ou pulmonar não seja clinicamente evidente. Pacientes com HIV/AIDS com pneumonia criptocócica, indica-se o exame do escarro, mas, principalmente, a cultura do lavado broncoalveolar (WILLIAMSON et al., 2016).

No caso de possível criptococose do SNC, especialmente em pacientes que apresentam deficits neurológicos focais ou história compatível com meningite lentamente progressiva, considere a obtenção de uma tomografia computadorizada ou ressonância magnética do cérebro antes de realizar uma punção lombar. Se uma lesão em massa é identificada, não realize uma punção lombar para obter fluido espinhal. Neste caso, é recomendável consultar um neurocirurgião para um procedimento alternativo por conta da pressão intracraniana muito elevada e o risco de hérnia cerebral. Na criptococose pulmonar, os achados radiográficos em pacientes assintomáticos e imunocompetentes podem incluir o seguinte: pneumonia com lesões focalizadas e granulomas variando de 2cm a 7cm, muito semelhantes à tuberculose (GALANIS et al., 2009; WILLIAMSON et al., 2016).

O material recebido para diagnóstico laboratorial será principalmente líquido ou lavagem broncoalveolar. Estes são considerados materiais estéreis, é recomendado uma centrifugação prévia de 3 ml deste material a 3500 revoluções por minuto (RPM), por 3

minutos, o líquido sobrenadante será descartado com cuidado, salvamos o precipitado que será usado na microscopia direta e cultura. O objetivo da centrifugação é concentrar a amostra, aumentando a capacidade de capturar as possíveis leveduras presentes em pacientes doentes (GALANIS et al., 2009; OLIVEIRA; SEVERO, 2009; WILLIAMSON et al., 2016).

Posterior à centrifugação, é recomendada a análise por microscopia direta para preparar a lâmina a ser analisada: utiliza-se uma pipeta de 200µl do precipitado previamente centrifugado que será misturado com uma gota de tinta da china (Nigrosina). Por conta da cápsula fúngica presente em *Cryptococcus* spp., o corante preto não consegue penetrar dentro da levedura, mais consegue entrar em outros componentes presentes na amostra, apresentado um fundo preto com leveduras refringentes. É importante, portanto, identificar estruturas celulares, como o núcleo celular, para evitar falsos positivos. Por exemplo, um problema da análise microscópica direta é que pessoas sem experiência podem confundir bolhas de ar com *Cryptococcus* spp. (GRUPO DE CONSENSO DE CRIPTOCOCOSE, 2008; OLIVEIRA; SEVERO, 2009).

O microscopista precisa conhecer que tem outros fungos que podem dar um falso positivo, por também apresentar cápsula como *Rhodotorula* spp., que é um fungo que coloniza tanto mucosa como pele em humanos. A principal diferença está na cultura de *Rhodotorula* spp., que é caracterizada por colônias vermelhas pela presença de pigmentos carotenoides. Outro fator importante é a carga de *Cryptococcus* spp. no material examinado na microscopia direta, pois a quantidade de leveduras pode ser baixa por conta de terapia antifúngica prévia. Então, microscopia negativa com tinta da china não descarta a infecção, precisando de cultura para conferir o diagnóstico.

Cultura é o padrão ouro para diagnóstico da criptococose. O material recebido, além de ser analisado por microscopia direta com tinta da china, será inoculado em ágar Sabouraud simples, ágar Sabouraud com cloranfenicol e NSA, incubado a uma temperatura até 37 graus Celsius. O cloranfenicol é um antibiótico bacteriostático de amplo espectro contra bactérias gram positivas e gram negativas, cujo objetivo é inibir a contaminação bacteriana que poderia estar presente na amostra, especialmente em escarro. A cultura em ágar Mycosel não é recomendada porque as cepas de *Cryptococcus* spp. são inibidas pela presença de cicloeximida neste meio. O

crescimento em cultura é considerado positivo pelo aparecimento de colônias leveduriformes, brancas ou cremes, com um fenótipo mucoide pela presença da cápsula, no entanto, no meio NSA, esta levedura hialina muda seu fenótipo pela produção de melanina, apresentado colônias castanhas (OLIVEIRA; SEVERO, 2009; STAIB, 1962).

Microscopia e cultura são exames complementares, isso significa que o resultado positivo em tinta da china, mais o crescimento da levedura com aspecto mucoide, leva ao diagnóstico laboratorial micológico de *Cryptococcus* spp. (MAFRA et al., 2008; OLIVEIRA; SEVERO, 2009). Como mencionado acima, existem duas espécies principais associadas à criptococose, que são: *C. gatti sensu latu* e *C. neoformans sensu latu*, que podem ser diferenciadas com o meio de CGB, onde as cepas *C. gatti sensu latu* crescem neste meio e mudam a cor para um azul-cobalto. O meio CGB, por ter variáveis, não é mais utilizado no diagnóstico clínico. Agora são usadas técnicas moleculares para genotipagem que, além da distinção entre *C. gatti sensu latu* e *C. neoformans sensu latu*, ajudam na identificação das sete espécies dentro deste complexo (PÉREZ et al., 2003).

O teste serológico de sangue e LCR são recomendados sempre que a infecção criptocócica do SNC seja considerada. Os testes de antígenos estão frequentemente fora de alcance, em países em desenvolvimento, devido ao custo. Como resultado, a criptococose geralmente não é diagnosticada em muitas regiões. Em 2009, um ensaio de exame de fluxo lateral (LFA) para diagnóstico de criptococose foi desenvolvido, sendo um teste imunológico baseado nos antígenos capsulares (CrAg) de *Cryptococcus*. Um estudo de pacientes infectados pelo HIV na Tailândia comparou resultados de LFA com cultura e imunoensaio enzimático (EIA). Os resultados mostraram um alto nível de concordância entre os testes LFA e EIA, o que sugere que LFA pode ser potencialmente útil como um ensaio com menores requerimentos para melhorar o diagnóstico e atendimento da criptococose em áreas com recursos insuficientes (LINDSLEY et al., 2011).

2.4 Fatores de virulência.

O patógeno fúngico humano do género *Cryptococcus* é capaz de adaptar-se rápida e efetivamente a diferentes condições, favorecendo sua sobrevivência no meio ambiente e no hospedeiro infectado susceptível (ALSPAUGH, 2016). Muitos fenótipos microbianos foram especificamente correlacionados à virulência deste patógeno

oportunista, como a produção de cápsula, a formação de melanina, a secreção de várias enzimas (protease, urease e fosfolipase), a termotolerância, a sobrevivência intracelular, a aquisição de nutrientes, a biofilme e, conseqüentemente, a resistência aos antifúngicos de uso terapêutico (ALSPAUGH, 2016; JOSEPH HEITMAN, THOMAS R. KOZEL, KYUNG J. KWON-CHUNG, JOHN R. PERFECT, 2011). Nesta seção, são descritos os fatores de virulência mais relevantes, exceto a produção de melanina, já que esta terá uma seção separada por ser o foco deste trabalho.

2.4.1 Cápsula

A cápsula em *C. neoformans* foi descrita desde o isolamento realizado por San Felice em 1894. Ele isolou uma cepa de um gânglio bovino e observou uma cápsula em torno das células. Em 1895, Curtis isolou *C. neoformans* em um meio à base de gelatina e relatou que a cápsula poderia ser corada com Fucsina de Ziehl, embora a coloração fosse difícil de fixar. Benham, em 1930, foi o primeiro a sugerir que a cápsula criptocócica era importante na virulência.

Estudos demonstram que, aproximadamente, 90% a 95% da cápsula é constituída principalmente por um polissacarídeo de elevado peso molecular (entre 1,700 kDa e 7,000 kDa) chamado glucuronoxilomanano (GXM), mais outro polissacarídeo chamado galactoxilomanano (GalXM), que representa os outros 4% a 5%, juntamente com algumas manoproteínas, como MP-98 e MP-99, que correspondem menos de 1% (MCFADDEN; DE JESUS; CASADEVALL, 2006).

Apesar de a cápsula ter sido considerada como um fator de virulência em *Cryptococcus* spp. por anos, foi apenas na década de 1990 que Chang et al., (1990) forneceram uma demonstração definitiva de seu papel. Eles clonaram quatro genes (isto é, *CAP10*, *CAP59*, *CAP60* e *CAP64*), os quais foram, individualmente, necessários para a biossíntese de cápsulas. Estas cepas mutantes, com fenótipo deficiente destes genes, eram avirulentas em ratos (CHANG; KWON-CHUNG, 1994, 1999).

É importante distinguir o papel da cápsula no meio ambiente, assim como um patógeno em um hospedeiro humano. Os investigadores especularam que esta cápsula pode proteger o fungo de dessecação ambiental e/ou predadores naturais, como nemátodos ou amebas (CHRISMAN et al., 2011; GARCÍA-RODAS et al., 2011; MYLONAKIS et al., 2002; STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003). No hospedeiro,

a cápsula atende a muitas funções protetoras, incluindo a redução das respostas imunes do hospedeiro, por meio da redução das citocinas inflamatórias (interleucina-10 e fator de necrose tumoral), da redução dos componentes do complemento e da inibição da capacidade de apresentação de antígenos pelos monócitos (KOZEL et al., 1995; RETINI et al., 1998).

A cápsula também pode atuar como um escudo para regular a fagocitose por macrófagos (CROSS; BANCROFT, 1995). O tratamento de monócitos com *Cryptococcus* spp. encapsulados ou *Cryptococcus* spp. Acapsulares, tratados com GXM, suprimiu a expressão de moléculas de complexo de histocompatibilidade principal classe II (MHC), que era importante na apresentação de antígeno (RETINI et al., 1998), mostrando, assim, que a cápsula pode inibir a apresentação de antígeno dos monócitos.

Uma vez dentro dos macrófagos, as células com cápsulas aumentadas foram mais resistentes a vários fatores de estresse que, provavelmente, desempenharão um papel significativo no fagolisossomo, já que a cápsula serve como proteção contra as espécies reativas de oxigênio, geradas pelo hospedeiro, de modo a proporcionar defesas antioxidantes efetivas (OSCAR ZARAGOZA et al., 2008; ZARAGOZA et al., 2010).

2.4.2 Termotolerância a 37 °C

Do ponto de vista da virulência dos fungos em mamíferos, tolerância térmica pode ser definida como a capacidade de crescer na gama 35 °C a 40 °C (ROBERT; CARDINALI; CASADEVALL, 2015). Entre as leveduras basidiomicéticas, apenas algumas espécies como *Cryptococcus bacillisporus* (75/77, 97%), *C. neoformans* (46/46, 100%), *Trichosporon asahii* (13/13, 100%), *T. inkin* (8 / 8, 100%), *Malassezia furfur* (16/16, 100%), *M. globosa* (6/9, 67%), *M. pachydermatis* (11/11, 100%), *M. slooffiae* (4/5, 90%) e *M. sympodialis* (6/6, 100%) são destacadas em termos de sua capacidade de crescer a altas temperaturas (ROBERT; CARDINALI; CASADEVALL, 2015)

O suporte experimental para a noção de que a endotermia restringe a infecção por fungos vem da observação de que os coelhos, que têm temperaturas centrais de 38°C a 39°C, são notoriamente resistentes à criptococose, e a infecção só pode ser induzida apenas em órgãos mais frios, como os testículos. Além da temperatura na

patogenia, a criptococose sistêmica pode ser induzida em coelhos após administração de corticosteroides, o que mostra que o sistema imunológico de mamíferos também contribui decisivamente para a defesa do hospedeiro contra fungos. Como foi descrito, os gêneros termotolerantes a 37°C incluíam o gênero *Cryptococcus*, sendo esta termotolerância um importante fator de virulência (ROBERT; CARDINALI; CASADEVALL, 2015).

C. neoformans é uma levedura que pode ser encontrada em fezes de pássaro, porém, as aves não se contaminam, provavelmente porque *C. neoformans* não vive bem na temperatura corporal aviária de 40° a 42°C (MITCHELL; PERFECT, 1995). Um perfil de transcrição de microensaios de genes de *C. neoformans* mostrou que a expressão de genes para crescimento em temperaturas de 37°C versus 25°C estão associados a 49 genes induzidos à temperatura de 37°C, incluindo MGA2, que apresentaram expressão significativamente maior durante o crescimento a 37°C (KRAUS et al., 2004).

2.4.3 Produção de enzimas

As enzimas são proteínas com atividade catalítica que podem degradar diferentes tipos de substratos. Diferentes micro-organismos usam estas enzimas como proteção em condições adversas. No caso do *Cryptococcus* spp., vamos abordar três principais enzimas: fosfolipase, urease e proteases não específicas. As fosfolipases clivam os fosfolípidos para produzir vários compostos biologicamente ativos. Este grupo heterogêneo de enzimas são capazes de hidrolisar uma ou mais ligações éster em glicerofosfolípidos. Estas enzimas alteram o microambiente da infecção e podem favorecer a sobrevivência de *C. neoformans* no hospedeiro (SANTANGELO et al., 2004).

As fosfolipases são categorizadas em cinco classes (A1, A2, B, C e D), dependendo do local de hidrólise da ligação éster de fosfolípido (ALSPAUGH, 2016). A ação das fosfolipases pode resultar na desestabilização das membranas, *C. neoformans* secreta uma enzima fosfolipase que mostra atividade, como a fosfolipase B (PLB), lisofosfolipase hidrolase e lisofosfolipase transacilase (MA; MAY, 2009). De fato, a ruptura do gene PLB1 levou a uma virulência reduzida *in vivo* e a inibição do crescimento de *Cryptococcus* em um modelo celular com linhagem de células do tipo macrófagos (COX et al., 2001). Tal como acontece com as proteinases, as fosfolipases

contribuem para a degradação da membrana celular do hospedeiro e, assim, a lise celular (MA; MAY, 2009).

Os isolados ambientais e clínicos de *C. neoformans* possuem atividade proteínase. Estas enzimas catalisam a clivagem de ligações peptídicas, resultando na digestão de proteínas, o que possibilita uma maior aquisição de nutrientes. Chen et al. (1996) atestaram que elas degradam proteínas hospedeiras, incluindo colágeno, elastina, fibrinogênio, imunoglobulinas e fatores de complemento (CHEN; BLANK; CASADEVALL, 1996). Tucker et al., (2002) propuseram que a replicação de *C. neoformans* dentro dos macrófagos seja acompanhada pela produção de enzimas, incluindo proteinases e fosfolipases, para danificar a membrana fagosomal (TUCKER; CASADEVALL, 2002). Portanto, as proteinases criptocócicas podem causar danos aos tecidos fornecendo nutrientes ao patógeno e proteção do hospedeiro.

Urease é uma enzima que catalisa a hidrólise de ureia em amônia (NH₃) e ácido carbônico (CO₂). Esta enzima é importante quanto ao fator de virulência para certas bactérias, como *Vibrio cholerae* e *Helicobacter pylori*. A urease criptocócica, associada ao gene *Ure1*, também se torna fator significativo de virulência. Exemplificando: os ratos infectados com cepas mutantes sem *Ure1* não expressam a uréase; os ratos infectados com cepas deficientes de urease vivem mais tempo do que os ratos infectados com cepa de tipo selvagem com produção normal de urease (COX et al., 2000).

Embora a urease não fosse necessária para o crescimento no cérebro, os padrões de disseminação no encéfalo, baço e outros órgãos, após a inoculação intravenosa, diferenciaram-se da cepa de tipo selvagem. Isso leva a proposta de que o gene *Ure1* é importante para a invasão do SNC ao aumentar o sequestro da levedura dentro do microcapilar (dentro do cérebro) durante a disseminação hematogênica, facilitando, assim, a transmissão do sangue para o cérebro (OLSZEWSKI et al., 2004).

Lacases são uma classe de metaloenzimas, dependentes de cobre, que foram descritas pela primeira vez em plantas como uma atividade muito versátil. Estas enzimas têm a capacidade de oxidar uma variedade de compostos difenólicos para a correspondente o-quinona altamente reativa, que pode formar aductos com uma variedade de proteínas contendo nucleófilos, assim como autopolimerizar moléculas, incluindo pigmentos semelhantes à melanina (NOSANCHUK; STARK; CASADEVALL, 2015). Além da importância na produção de melanina, por meio de

caminhos alternativos, podem proteger os *Cryptococcus* dos radicais livres tóxicos e citocinas pró-inflamatórias geradas pela anfotericina B (SABIITI et al., 2014).

2.4.4 Biofilme

Tradicionalmente, os microbiologistas têm estudado as doenças de origem infecciosa produzidas por microrganismos em estado planctônico. O isolamento dos patógenos em estado planctônico tem sido realizado por meio de cultura pura, porém, esse crescimento em cultura pura não poderia representar as condições no hospedeiro ou ambiente. Por exemplo, Donlan (2002) demonstrou que aproximadamente 80% de todas as bactérias no ambiente existem em comunidades de biofilme; e, ainda, estima-se que mais de 65% das infecções microbianas (fibrose cística, endocardite e outras), que são transmitidas por *Candida albicans* em humanos, envolvem a formação de biofilme. Estes patógenos fúngicos têm sido associados a dispositivos intrauterinos e dispositivos para cateter venoso central (DONLAN, 2002).

Os biofilmes microbianos são comunidades dinâmicas de micro-organismos fortemente ligados a superfícies bióticas ou abióticas que estão incluídas em uma matriz autoproduzida de exopolímero protetor (EPM). A dinâmica de formação dos biofilmes possui etapas definidas de desenvolvimento, como adesão, colonização, produção da matriz extracelular, maturação e dispersão (COSTERTON et al., 1995).

Segundo relatos de Walsh et al. (1986), relatam uma infecção por *C. neoformans*, envolvendo um shunt ventriculoatrial. Estudos ultraestruturais do shunt ventriculoatrial demonstraram organismos semelhantes a leveduras consistentes com *C. neoformans* dentro de um biofilme neste dispositivo (WALSH et al., 1986). Também existem vários relatos de infecção por *C. neoformans* em fístula de diálise peritoneal de politetrafluoroetileno (BRAUN et al., 1994) e próteses de válvulas cardíacas (BANERJEE., 1997).

O uso crescente de shunts ventriculoperitoneais para controlar a hipertensão intracraniana, associada à meningoencefalite criptocócica, sugere a importância de investigar as propriedades formadoras e as características do biofilme em *Cryptococcus* spp. O interesse dos pesquisadores em estudar o papel dos biofilmes microbianos em doenças humanas decorre da observação de que os micróbios nos biofilmes apresentam características fenotípicas únicas que aumentam a resistência dos mecanismos

imunológicos do hospedeiro e da terapia antimicrobiana (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006, 2015). A erradicação bem-sucedida de biofilmes *in vivo* geralmente requer concentrações de drogas antimicrobianas que, geralmente, são tóxicas para o hospedeiro. Em *Cryptococcus neoformans*, os biofilmes são mais resistentes do que as células planctônicas em relação à anfotericina B e à caspofungina, além de serem completamente resistentes a fluconazol e voriconazol (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006).

Outro fator importante é o estresse oxidativo causado pelas espécies reativas de oxigênio produzidas como mecanismo de defesa para o controle de vários agentes infecciosos. As células de *C. neoformans*, dentro dos biofilmes, são mais resistentes do que as células planctônicas submetidas ao estresse oxidativo, porém, permanecem vulneráveis a péptidos antimicrobianos catiônicos (MARTINEZ; CASADEVALL, 2015).

Embora não tenham sido esclarecidos todos os mecanismos de patogenia de um biofilme de forma geral, como o aumento da densidade celular, o estado fisiológico em que as células se encontram, a presença de células persistentes, a matriz exopolimérica e a resistência mediada por bomba de efluxo, poderiam estar associadas para explicar os diferentes mecanismos patogênicos já tratados (RAMAGE et al., 2012).

2.4.5 Melanina: sua identificação e quantificação.

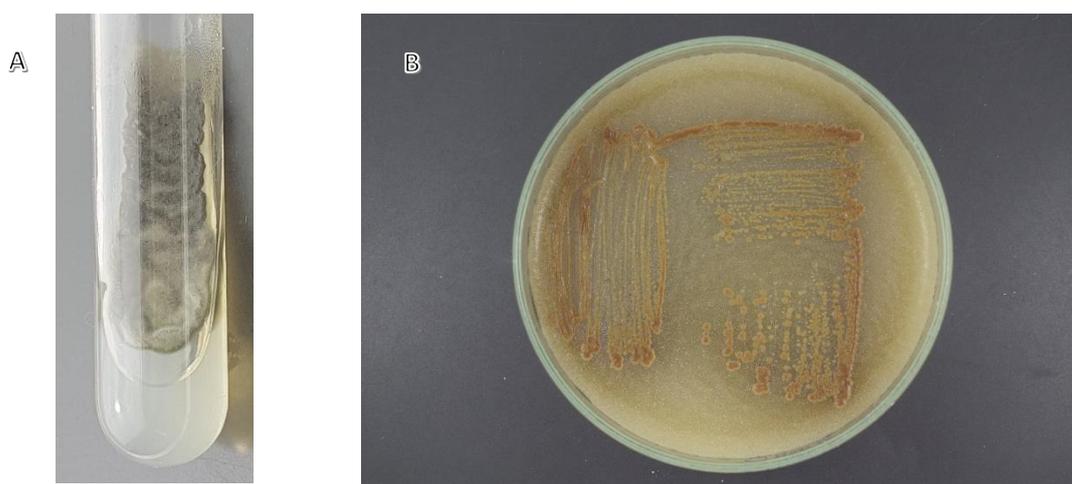
A melanina é um pigmento na gama de castanho até preto, formado por macromoléculas biológicas que são compostas por vários tipos de monômeros indólicos ou fenólicos, geralmente complexados com proteínas ou carboidratos (NOSANCHUK; STARK; CASADEVALL, 2015). De fato, uma variedade de enzimas diversas, incluindo fenoxidases, tirosinases, catecolases e lacases, podem gerar melaninas (SÁNCHEZ-FERRER et al., 1995). Esta variedade de enzimas produtoras de melanina tem uma explicação, já que os membros de todos os reinos biológicos são capazes de produzir melanina, incluindo uma ampla gama de fungos, bactérias e helmintos que causam doenças em humanos.

Comparativamente no caso dos mamíferos, células especializadas da epiderme têm sido descritas como produtores de melanina. Os melanócitos produzem este pigmento via tirosinase (TRY) em base ao metabolismo de tirosina ou L-3, 4 -

dihidroxifenilalanina (l-DOPA) (SÁNCHEZ-FERRER et al., 1995). A biossíntese da melanina é modulada pela expressão do fator de transcrição associado à microftalmia (MITF), que regula a expressão transcricional de TRY por meio dos genes de proteínas relacionados a TRY 1-2 (TRP-1 e TRP-2) (KIM et al., 2008). Além da regulação genética, a tirosinase é dependente de cobre, sendo estas vias interessantes no bloqueio ou modulação da melanogênese.

Retornando aos fungos patogênicos produtores de melanina, estes têm duas variedades: os fungos demáceos, cuja característica principal é a produção intrínseca constante de melanina; e os fungos melanizados, que produzem melanina dependendo das condições ambientais. Os fungos demáceos, também conhecidos pelos nomes comuns de fungos negros (ou leveduras negras, do inglês *black yeast*), são fungos ambientais pretos, como exemplo temos a *Hortaea werneckii* (Figura 4A). Este fungo filamentoso causa *Tinea nigra* no hospedeiro humano e aparece como uma mácula hiperpigmentada da pele.

Figura 4 - Comparação entre fungo demáceo e melanizado



A - Ágar batata sem suplemento de compostos fenólicos com colônias demáceas de *Hortaea werneckii*.

B - Ágar semente de níger com colônias melanizadas de *Cryptococcus* spp. Fonte ACOSTA, 2017.

Os fungos melanizados são caracterizados por terem um estimulante e condições específicas para expressar e produzir melanina. Habitualmente, estes fungos são hialinos, porém, nos meios com presença de compostos fenólicos (NSA, ágar l-DOPA), são capazes de produzir melanina (POLACHECK, 1991). Como exemplo mais representativo temos as cepas de *Cryptococcus neoformans/gatti* sensu latu (Figura 4B).

Esta melanina fúngica tem duas vias principais de produção: a via da policétida sintase por médio do metabolismo de 1,8-dihidroinaftaleno (DHN). Alternativamente, alguns fungos produzem melanina por via das fenoxidases por meio do metabolismo de L-3,4- dihidroxifenilalanina (l-DOPA) (MICHAEL H. WHEELER, 1988).

O *Cryptococcus* spp. foi usado em vários estudos de melanina fúngica porque esse tipo de levedura requer a adição de substratos fenólicos exógenos para produzir melanina via uma fenoxidase, que se denominou lacase. Assim, a melanização pode ser observada de perto, alterando a quantidade e o tipo de substrato (SALAS et al., 1996).

A análise desta melanina fúngica tem sido um dos maiores desafios. As metodologias clássicas de biofísica não podem ser aplicadas para decifrar a estrutura da melanina porque este polímero é insolúvel em fluidos aquosos ou orgânicos, e qualquer tentativa de solubilização irá danificar sua estrutura (NOSANCHUK; STARK; CASADEVALL, 2015).

A dificuldade de se definir melanina com base em técnicas de estado de solução ou cristalográficas permitiu o uso de abordagens alternativas para sua caracterização estrutural, incluindo a espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) que, baseada na presença de radicais livres orgânicos estáveis, fez a análise da estrutura de um composto (NOSANCHUK; STARK; CASADEVALL, 2015).

Para obter a análise e quantificação da melanina fúngica, é obrigatória a extração das células previamente melanizadas. Dentro da célula, a melanina localiza-se no interior da parede celular, porém, a distribuição e a quantidade variam amplamente entre as espécies. No caso de *C. neoformans*, a melanina é, antes de tudo, detectada ao longo da membrana plasmática, que enche toda a parede celular ao longo do tempo (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003).

O procedimento usado para a extração da melanina é uma combinação química e física, no entanto, como foi relatado por ROSAS et al., (2000) e BUTLER; DAY, (1998), este procedimento pode mudar a composição original desta melanina. Os métodos atuais para a quantificação de melanina são difíceis de aplicar, demorados e caros, isso devido ao uso de microscopia eletrônica de varredura que requer equipamentos e reagentes de alto custo (FERNANDES et al., 2016).

Outra metodologia utilizada é a quantificação da atividade da lacase com a interpretação por espectrofotometria a 436 nm. Apesar de ser barata, é uma estimativa. Também é importante lembrar que a atividade desta enzima é variada e modificada pela temperatura e outros fatores adversos (SINGHAL; CHOUDHARY; THAKUR, 2012). Como já foi mostrado, a avaliação e análise de melanina é uma tarefa difícil.

Todos os estudos têm sido desenvolvidos principalmente em um meio líquido chamado meio mínimo (ROSAS et al., 2000). Este meio é quimicamente conhecido e composto por 0,015 mole l^{-1} de glicose, 0,01 mole l^{-1} de $MgSO_4$, 0,0294 mole l^{-1} de K_2HPO_4 , 0,013 mole l^{-1} de glicina, e 0,003 mole l^{-1} tiamina, pH 5,5. Sendo suplementado com um composto fenólico, que pode ser a l-DOPA, é a única fonte de composto fenólico possível de ser controlada, permitindo, assim, avaliar e quantificar a produção de melanina.

A análise deste pigmento é realmente importante, já que a melanina é um fator significativo na virulência de vários microrganismos, incluindo *C. neoformans lato sensu* e *C. gattii lato sensu* (BUTLER; DAY, 1998; DA SILVA et al., 2009; NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003; NOSANCHUK; STARK; CASADEVALL, 2015; RANI et al., 2012). As células melanizadas do gênero *Cryptococcus* são menos susceptíveis à anfotericina B em comparação às células não melanizadas (BUCHANAN; MURPHY, 1998; WANG; CASADEVALL, 1994). Verificou-se que a deposição de melanina na parede da célula pode inibir a opsonização por anticorpos específicos (HUFFNAGLE et al., 1995). Observou-se também que este pigmento ajuda a proteger, de modo eficaz, este fungo de compostos oxidativos produzidos por macrófagos (WANG; AISEN; CASADEVALL, 1995).

A interrupção dos genes essenciais para a produção de melanina (*CNLAC1*) em *C. neoformans* resulta, consideravelmente, na redução da disseminação de fungos, (OLSZEWSKI et al., 2004) assim como na letalidade (SALAS et al., 1996) de certos

tipos de infecção murino. Estes estudos mostram que as cepas de *C. neoformans* mutantes, geneticamente bloqueadas para a produção de melanina, são avirulentas, tornando a modulação ou inibição de melanina uma importante estratégia para reduzir a virulência potencial em pacientes suscetíveis.

Em relação à inibição da melanina, existem poucos estudos, especificamente foram relatadas três drogas como inibidoras deste pigmento. O primeiro relato de uma droga nesta área foi feito por Nosanchuk et al. (2001), em seu artigo “o glifosato inibe a melanização de *Cryptococcus neoformans* e prolongada a sobrevivência de ratos após infecção sistêmica” (NOSANCHUK; OVALLE; CASADEVALL, 2001). O glifosato inibiu a autopolimerização da l-DOPA e a oxidação da l-epinefrina pelas células criptocócicas. No entanto, pela toxicidade deste herbicida, é impossível passar para aplicações clínicas, pois, segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), da Organização Mundial de Saúde (OMS), o glifosato foi classificado como um "potencial carcinógeno humano".

Martinez et al. (2007) apresentam o artigo “voriconazol inibe melanização em *Cryptococcus neoformans*” (MARTINEZ et al., 2007). Eles relatam que o voriconazol atua inibindo a enzima 14-alfa-esterol demetilase, que é essencial na biossíntese de ergosterol. Além disso, o voriconazol afeta a melanização em *C. neoformans*, interagindo diretamente com lacase, porém não é usado como droga na terapia da neurocriptococose.

Dalisay et al. (2001), em seu artigo “Ptilomicina A inibe lacase e melanização em *Cryptococcus neoformans*” (DALISAY DS, SALUDES JP, 2011), falam que a ptilomicina A é um alcalóide antifúngico espirocíclico da guanidina extraído da esponja marinha *Monanchora arbuscula*. Eles relatam ainda que a Ptilomicina A mostrou suprimir fortemente a melanogênese de *C. neoformans in vitro* por inibição potente da lacase. Este composto, extraído de uma alga, é um fármaco em estudo que necessita de uma melhor descrição do mecanismo de ação e aplicabilidade clínica. Embora a melanina seja o segundo mecanismo mais importante de virulência em *Cryptococcus* spp., existem poucos estudos relacionados com a inibição de melanina.

2.4.5.1 Inibidores da bomba de prótons na inibição de melanina.

Os inibidores da bomba de prótons (IBPs) são medicamentos utilizados para o tratamento de distúrbios de secreção de ácidos gastrointestinais, como a doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), e prevenção da doença de úlcera péptica (PUD), clinicamente o uso destas drogas alteraram dramaticamente a gestão destas condições desde a sua introdução. Os IBPs são os medicamentos mais potentes para redução da produção de ácidos gástricos, sendo ainda, em geral, os mais eficazes para o tratamento da DRGE. Atualmente, existem cinco IBPs aprovados pela administração de drogas e alimento dos Estados Unidos (FDA) (KNOLLMAN; CHABNER; BRUNTON, 2011).

Todos estes IBPs são administrados por via oral, com a exceção do pantoprazol, que pode ser administrado nas formulações orais e intravenosas. O pantoprazol IV foi aprovado atualmente pela FDA para o controle dos sintomas de DRGE em pacientes impossibilitados de tomar IBPs orais e estados de hipersecreção de ácido, como: síndrome de Zollinger-Ellison. O desenvolvimento contínuo de novos medicamentos, com diferentes propriedades farmacocinéticas, e a experiência clínica com os IBPs, bem como o aperfeiçoamento, em nossa compreensão, dos distúrbios ácido-pépticas, levantaram muitas questões sobre o papel dos IBPs na prática clínica (KNOLLMAN; CHABNER; BRUNTON, 2011).

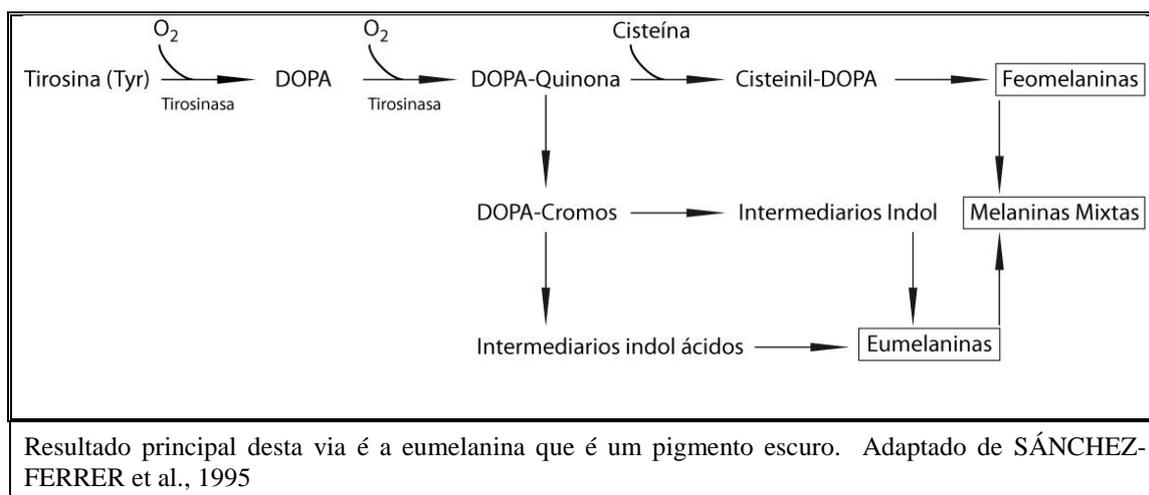
O controle fisiológico da secreção de ácido no estômago é dado por segundos mensageiros que responde à ligação de gastrina, acetilcolina, histamina, prostaglandinas. O processo final da secreção ácida acontece na parede das células parietais do estômago, relacionado com uma bomba de protons (H^+ , K^+ -ATPase), que secreta iões de hidrogénio para o lúmen gástrico em troca de iões de potássio. O IBP se acumula no canalículo secretor de ácido da célula parietal, onde é protonado rapidamente a sua forma ativa. Esta forma ativa, uma sulfenamida catiónica, liga-se a um grupo sulfidrilo na H^+ , K^+ -ATPase (bomba de protões) impedindo a secreção de ácido no lúmen gástrico (KNOLLMAN; CHABNER; BRUNTON, 2011).

Além da função como protetores gástricos, estudos desenvolvidos por BAEK, LEE, (2015) e MATSUI et al., (2015) mostram efeito na inibição da melanogênese em células tratadas com IBPs. Eles descobriram que o omeprazol e seus congêneres, estreitamente relacionados, inibiram a melanogênese em concentrações micromolares em células de melanoma de camundongo B16, melanócitos epidérmicos humanos

normais e em um modelo de pele humana reconstruída (MATSUI et al., 2015). O tratamento com rabeprazol resultou numa forte inibição da produção de melanina, sendo está dose dependente, atingindo a tirosinase em cogumelos (TYR) (BAEK; LEE, 2015).

Os melanócitos são células especializadas na produção de melanina em várias células eucarióticas de mamíferos. As duas primeiras reações, a hidroxilação de tirosina em DOPA (3,4-dihidroxi-fenilalanina) e a oxidação de DOPA em dopaquinona, são catalisadas pela enzima tirosinase que é dependente de cobre e, portanto, considerada a principal enzima na síntese de melanina. O processo da produção da melanina ocorre nos melanosomas dos melanócitos e está representado na Figura 5 (SÁNCHEZ-FERRER et al., 1995; TIEF et al., 1996).

Figura 5 - Reação de produção de melanina em melanócitos



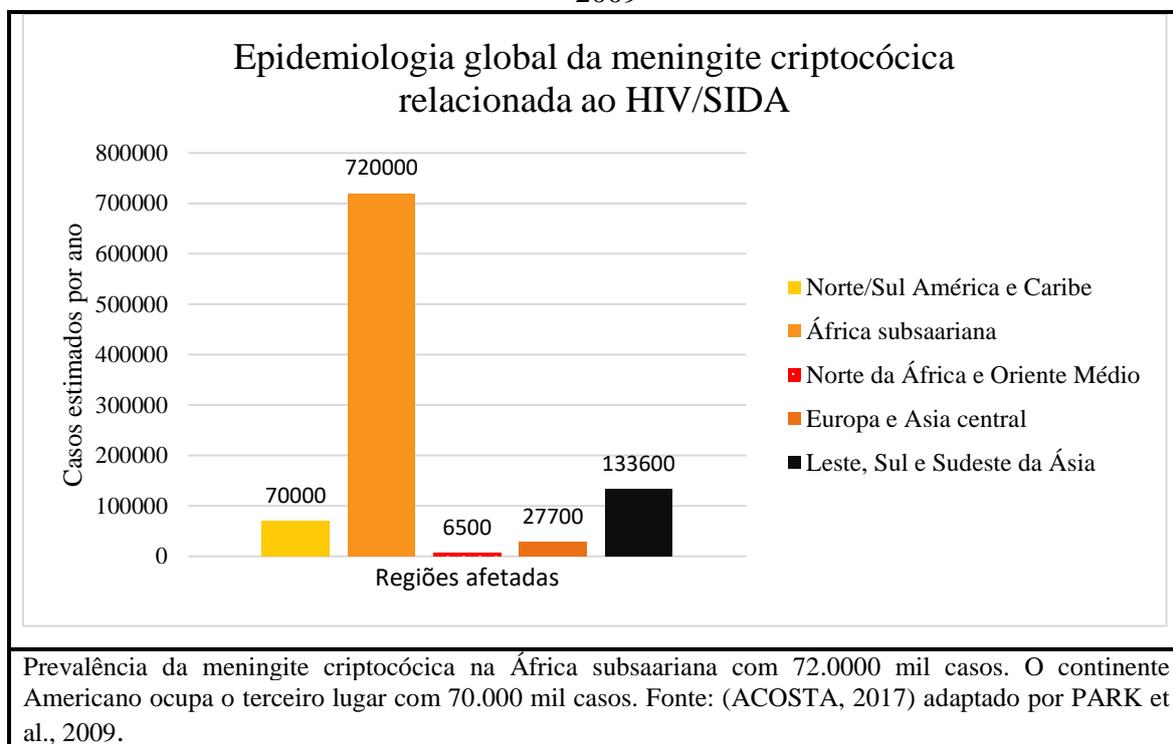
A DOPA é um composto fenólico, cuja função da tirosinase é oxidar este composto fenólico de duplo anel. Esta enzima é considerada um fenoloxidase. *Cryptococcus* spp. possui uma enzima fenoloxidase, chamada lacase, para produção de melanina, que é elaborada a partir de l-DOPA. Diante disso, surge a hipótese de que os inibidores de bomba de prótons poderiam ter um efeito na inibição de melanina em cepas de *Cryptococcus* spp.

2.5 Criptococose: epidemiologia, ecologia, patogenia, principais formas clínicas.

A criptococose é uma micose sistêmica causada por *Cryptococcus neoformans lato sensu* e *Cryptococcus gatti lato sensu*. Atualmente, o paradigma de infecção, unicamente oportunista, tem sido modificado pela ocorrência da doença em pacientes imunocompetentes (FISHER; VALENCIA-REY; DAVIS, 2016). Os patógenos incluídos dentro do complexo *C. gatti sensu lato* foram relacionados especificamente com infecção em pacientes imunocompetentes (CHAYAKULKEEREE; PERFECT, 2006; GALANIS et al., 2009). Porém, esse conceito tem sido atualizado, já que duas espécies, *C. bacillispora* (VIII) e *C. tetragattii* (VGIV), foram encontradas principalmente em pacientes infectados pelo HIV/Aids no Sul da Califórnia e no Zimbawe, respectivamente, tendo como causa principal a meningite criptocócica (NYAZIKA et al., 2016; SPRINGER et al., 2014).

Segundo estudo de Park et al. (2009), estima-se que um milhão de casos de meningite criptocócica ocorrem entre pessoas com vírus da imunodeficiência humana na fase de síndrome de imunodeficiência adquirida (HIV/AIDS). Esses casos acontecem em todo o mundo a cada ano, o que resulta em cerca de 625.000 mortes. A maioria dos casos de meningite criptocócica ocorre na África subsaariana (Figura 6). Ao longo de grande parte da África subsaariana, *Cryptococcus* spp. é a causa mais comum de meningite em adultos (PARK et al., 2009). Estudos mais atuais de Rajasingham et al. (2017) estimam que o número de casos por ano de meningite criptocócica chegam a 223.100 mil, com cerca de 181.100 mil óbitos. A diminuição na prevalência dos estudos de Rajasingham et al. (2017) é explicado por conta da terapia antirretroviral.

Figura 6 - Epidemiologia global da meningite criptocócica relacionada ao HIV/Aids ano 2009



O continente Americano está em terceiro lugar no estudo de Park et al. (2009), o que mostra a relevância da doença em nosso continente. Dentro da descrição epidemiológica desta doença, criptococose inclui como agente etiológico sete espécies com seus respectivos genótipos, tal como foi previamente descrito na Figura 2.

Meyer et al. (2003), no estudo “tipagem molecular de isolados Ibero-Americanos de *Cryptococcus neoformans*”, aplicam impressões digitais de PCR (Fingerprint PCR) e tipificação do gene *URA5* com a metodologia RFLP para investigar a estrutura genética e possíveis relações epidemiológicas entre os isolados clínicos e ambientais obtidos na América Latina e na Espanha (MEYER et al., 2003).

Meyer destaca que *Cryptococcus VNI* é o genótipo mais comum dos isolados estudados, variando entre os diferentes países estudados: México: 96.9%; Guatemala: 93.3%; Colômbia: 45.2%; Peru: 93.3%; Chile: 42.1%; Argentina: 82.5%; Venezuela: 75%; e Brasil: 82.3%. Correlacionado à descrição atualizada de Hagen e colaboradores, a espécie *Cryptococcus neoformans stricto sensu* seria a mais predominante (HAGEN et al., 2015). Para *Cryptococcus gattii sensu lato*, não existe um genótipo comum

comparado com *Cryptococcus neoformans sensu latu*, que apresenta alta variabilidade entre os países estudados por Meyer et al., (2009).

Chen et al. (2014) destacam *C. gattii*, tipo molecular VGII, como o mais frequente em América. O surto de *C. gattii*, tipo molecular VGII, foi verificado na América do Norte, com destaque para a ilha de Vancouver, e no Canadá, entre os anos de 2003 a 2005 (MACDOUGALL et al., 2007). Já a Australásia, Ásia e Europa mostram que o *C. gattii*, tipo molecular VGI, teve maior prevalência dos isolados estudados, numa porcentagem de 65% até 73% (CHEN; MEYER; SORRELL, 2014). Comparado à descrição atualizada de Hagen et al. (2015), as espécies *C. gatti stricto sensu* e *C. deuterogatti* foram as de maior relevância nos estudo de Chen et al. (2014) (HAGEN et al., 2015).

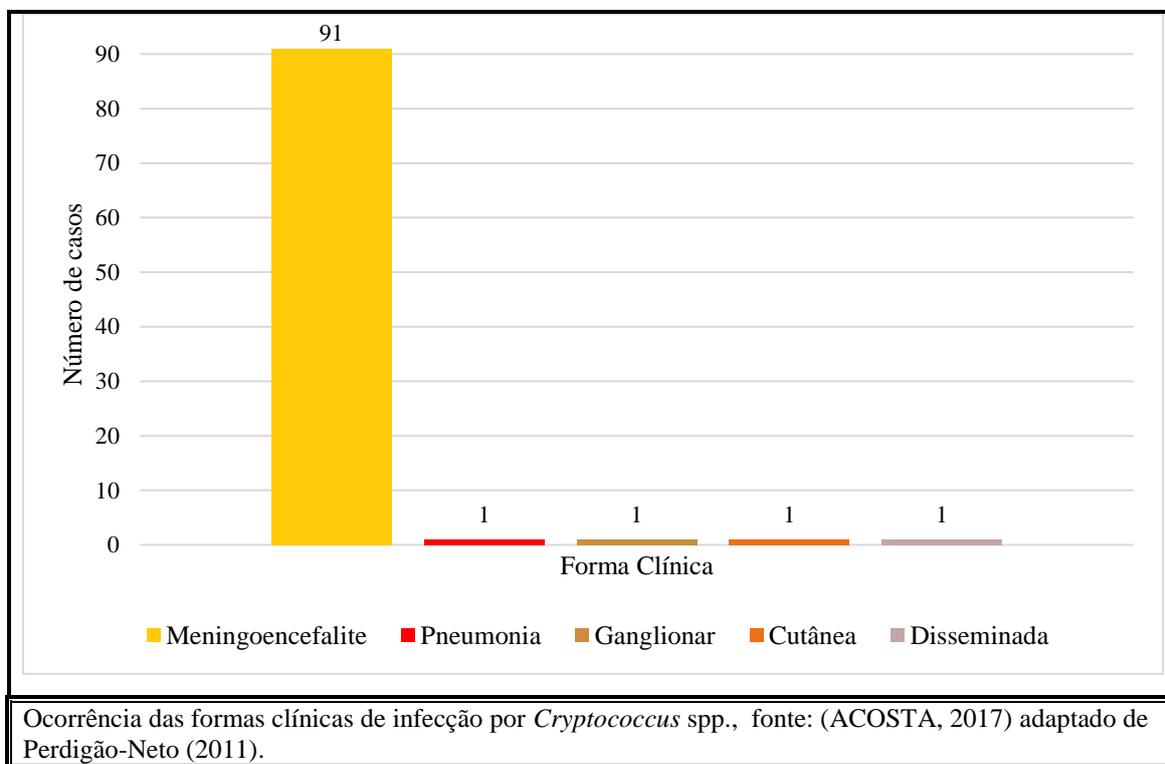
No Brasil, dados do Sistema de Internação Hospitalar do Sistema Único de Saúde-SIH-SUS demonstram que a criptococose apresentou o maior número de internações no período de 2000 a 2007, sendo que a criptococose não é uma doença de notificação compulsória para o Ministério de Saúde no Brasil, pois não se têm dados oficiais de prevalência desta doença. Os estudos de Nishikawa et al. (2003) relatam que, nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, há predominância de criptococose por *C. neoformans*, enquanto a criptococose por *C. gattii* possui distribuição geográfica mais restrita às áreas de clima tropical e subtropical, notadamente nas regiões Norte e Nordeste (NISHIKAWA et al., 2003; SOUTO et al., 2016).

Vale ressaltar que, no Brasil, a criptococose por *C. gattii* possui uma das maiores taxas de prevalência da América do Sul, levando a crer que essa espécie parece ser endêmica na região Nordeste do país (NISHIKAWA et al., 2003). Em estudo de Prado et al. (2009), que investigaram micoses sistêmicas como causa primária de morte em indivíduos com Aids, a criptococose foi atribuída como causa de morte em 50,9% dos pacientes com HIV/Aids, cujo óbito foi associado a micoses sistêmicas (PRADO et al., 2009).

Dados epidemiológicos sobre a criptococose na região Nordeste, em especial no Estado do Ceará, ainda são escassos. Na dissertação de Perdigão-Neto (2011), para a obtenção do título de mestrado em Microbiologia Médica pela Universidade Federal do Ceará, ele desenvolve um estudo para coleta de dados, entre os períodos de janeiro de 1985 a julho de 2010, no Hospital de doenças infecciosas “São José”, localizado na

cidade de Fortaleza, estado do Ceará, referente a 95 casos de criptococose, com predomínio da meningoencefalite, com 91 casos. A Figura 7 apresenta a distribuição das formas clínicas de criptococose (PERDIGÃO-NETO, 2011).

Figura 7 - Distribuição das formas clínicas de criptococose



O *C. neoformans* é encontrado predominantemente em solos contendo fezes de pombo (OH; HWANG, 2005), enquanto *C. gattii* é isolado em madeira em decomposição e nos solos que contêm essa madeira (KIDD et al., 2007). As hipóteses atuais explicam a disseminação mundial de *C. neoformans* ao afirmar que estas espécies ganharam a capacidade de metabolizar as fezes de pombo que se tornou seu nicho. Essas adaptações podem ter contribuído para que esses agentes patogênicos fossem espalhados pelo mundo, como vetores, por intermédio das aves em suas rotas migratórias (GRANADOS; CASTAÑEDA, 2005). Os propágulos fúngicos são achados em excretas de aves, especialmente pombos, para *C. neoformans lato sensu*; e em madeira em decomposição, para *C. gattii*; e podem ser inalados pelo hospedeiro suscetível (Figura 8A).

A patogênese da criptococose é determinada por três fatores principais: o *status* da defesa do hospedeiro, a virulência da cepa e o tamanho do inóculo. Além disso, *C.*

neoformans é distribuído globalmente, conhecido também como cosmopolita, enquanto *C. gattii* pode ser encontrado em regiões de climas tropical ou subtropical. No entanto, o aumento da vigilância já identificou reservatórios ambientais para *C. gattii* no Norte dos EUA, no Canadá e no Norte da Europa, indicando que esta espécie também pode ter um alcance ecológico ainda maior do que o reconhecido anteriormente (MAY et al., 2015).

Dentro do pulmão, *Cryptococcus* spp. podem causar pneumonia em pacientes imunossuprimidos. No entanto, em hospedeiros imunocompetentes, as células fúngicas são eliminadas pelo sistema imunológico ou podem estabelecer uma infecção latente assintomática (Figura 8B). Numa possível imunossupressão subsequente, esta infecção latente pode se disseminar para outros tecidos, principalmente o sistema nervoso central (SNC) (WILLIAMSON et al., 2016).

C. neoformans se prolifera dentro de células fagocíticas hospedeiras do pulmão, o que pode conferir vantagens em termos de disseminação e proteção imune. As interações iniciais da levedura com células hospedeiras podem ser mediadas por uma adesina e são capazes de reconhecer o hospedeiro dos componentes das cápsulas fúngicas (WANG; ZHAI; LIN, 2012).

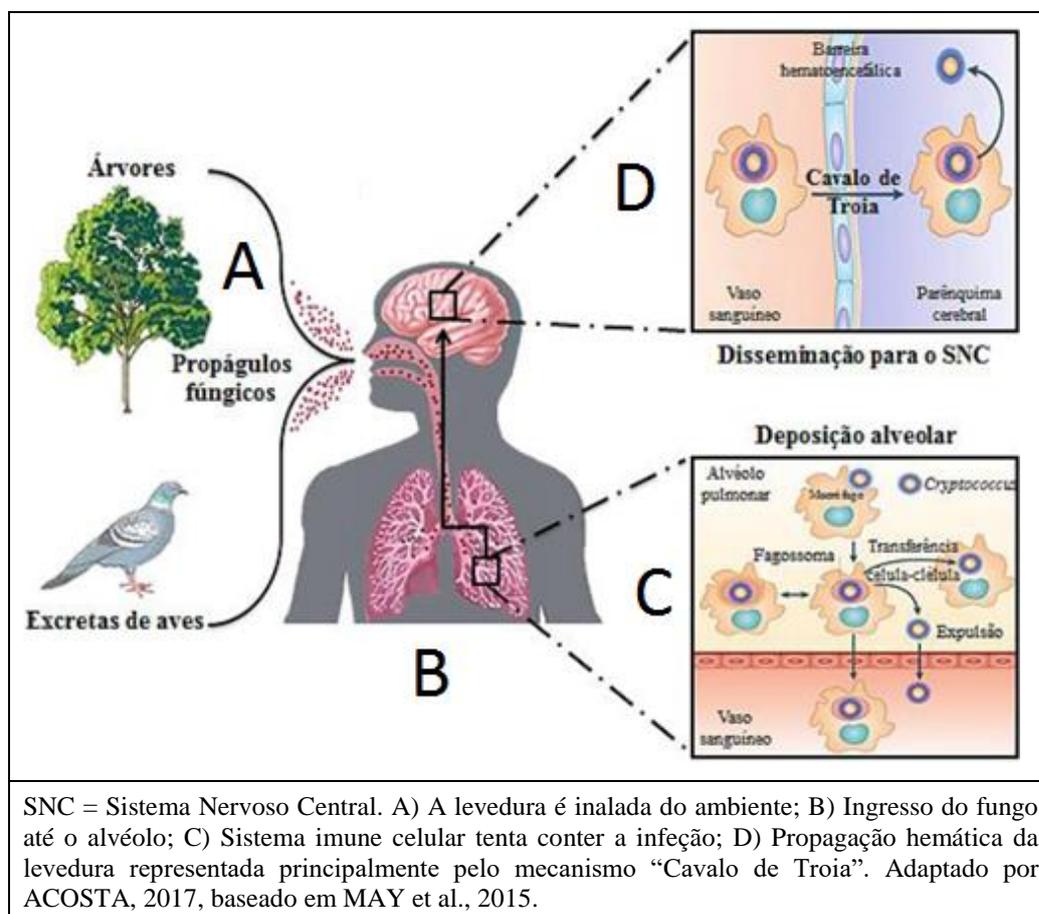
A levedura não encapsulada é prontamente fagocitada e destruída, enquanto que os organismos encapsulados são mais resistentes à fagocitose. A cápsula de polissacarídeo, composta principalmente por GXM e GalXM, tem propriedades antifagocíticas e pode ser imunossupressora. As propriedades antifagocíticas da cápsula evitam o reconhecimento da levedura pelos fagócitos e inibem a migração de leucócitos para a área de replicação fúngica (MAY et al., 2015; TAYLOR-SMITH; MAY, 2016).

É importante salientar que os *Cryptococcus* apresentam uma estratégia notável para escapar de fagócitos (Figura 8C). Este processo, que foi rotulado de vomocitose ou extrusão, busca induzir a fusão da membrana fagosomal com a membrana plasmática, resultando na expulsão dos fungos do fagócito (NICOLA; ROBERTSON, 2011). Vários fatores de virulência criptocócica, como melanização e secreção de urease, combinam-se para proteger o fungo do ambiente severo, dentro de células fagocíticas, neutralizando espécies reativas de oxigênio e pH, permitindo-lhe sobreviver e proliferar dentro dessas células (CHOWDHARY et al., 2012).

Uma característica fundamental da patogênese criptocócica implica na saída de *Cryptococcus* spp. dos pulmões para a circulação periférica de sangue e entrada no compartimento do SNC. O SNC é um sítio imunoprivilegiado e um ambiente altamente estéril e, portanto, *Cryptococcus* spp. deve ter evoluído com métodos potentes para atravessar a barreira hematoencefálica e conseguir subsistir no SNC. Existem três mecanismos propostos para penetrar nesta barreira impermeável. Primeiro, as células *Cryptococcus* poderiam forçar seu caminho entre as junções apertadas das células endoteliais em um processo conhecido como paracytose, usando proteases como a Mpr1 (metaloproteinase 1) para promover a migração transendotelial (VU et al., 2014).

O segundo mecanismo de penetração da barreira hematoencefálica é a transcitose. O ácido hialurônico, situado na superfície da célula criptocócica, liga-se ao receptor CD44, no endotélio luminal do vaso sanguíneo, anexando o fungo à célula hospedeira. Esta ligação induz a remodelação de actina dependente de proteína C na célula hospedeira, levando a engolir a célula de *Cryptococcus* anexada (JONG et al., 2008). Tem sido postulado que *Cryptococcus* spp. passa por meio da barreira hematoencefálica, ou seja, "pega carona" dentro dos fagócitos hospedeiros, e por isso é conhecido como a hipótese do "Cavalo de Troia" (Figura 8D). Estudos apoiam a hipótese de que os fagócitos atuam como portadores de fungos, afetando a barreira hematoencefálica, e, assim, permitem o ingresso até o SNC (CHARLIER et al., 2009; KECHICHIAN; SHEA; DEL POETA, 2007).

Figura - 8 Principais etapas da patogênese da criptococose.



Clinicamente, a criptococose pode se manifestar como uma infecção pulmonar primária (GUY et al., 2012); infecção da pele (SÉGOLÈNE et al., 2003); osteíte (WOOD; MIEDZINSKI, 1996); meningoencefalite (WILLIAMSON et al., 2016); prostatite (CHANG et al., 2008). Desta ampla gama de patologias, a meningoencefalite representa cerca de 90% das doenças diagnosticadas por *Cryptococcus* spp. no ser humano, seguida pela condição pulmonar de 5% a 9% dos casos, sendo a percentagem restante dada pelas outras possíveis manifestações de criptococose.

A infecção do sistema nervoso central pode afetar o tecido cerebral, desenvolvendo encefalite, e as meninges, causando meningite. Habitualmente, existe infecção das meninges e do cérebro produzindo meningoencefalite criptocócica. Este neurotropismo tem sido associado a uma série de fatores de virulência, específicos dos criptocócicos, que facilitam a penetração da barreira hematoencefálica, tais como metaloproteinases e uréases, as enzimas que causam neuroimunomodulação, como

lacase que usa dopamina, epinefrina, e outros compostos fenólicos que atuam no cérebro na produção de melanina (WILLIAMSON et al., 2016). De fato, a lacase desempenha papel importante na disseminação de *Cryptococcus* até o SNC. As cepas mutantes que não possuem produção de lacase mostram a atenuação da virulência devido à incapacidade de escapar dos pulmões (NOVERR et al., 2004).

As manifestações mais comuns da criptococose no SNC são, geralmente, de natureza subaguda ou crônica. Os pacientes infectados pelo HIV/Aids podem ter sintomas mínimos ou inespecíficos (Tabela 2). A duração média desde o início dos sintomas até a apresentação da doença é de duas semanas em pacientes com infecção por HIV/Aids, e de seis a doze semanas em casos não associados a HIV/Aids (WILLIAMSON et al., 2016). O artigo de GOMEREP et al. (2010) apresenta a frequência dos principais sinais e sintomas na meningoencefalite criptocócica em pacientes infectados pelo HIV-1: a maior ênfase é dada para a dor de cabeça em 100% dos pacientes estudados, seguida de febre e rigidez no pescoço, 70%; e outras manifestações em menor frequência.

Tabela 1- Sinais e sintomas associados à meningoencefalite

Dor de cabeça 100%

Febre 72% e pescoço rígido 77.8% (com uma resposta inflamatória agressiva, menos comum)

Náuseas e vômitos 55.6% (com aumento da pressão intracraniana)

Defeitos auditivos, convulsões, ataxia, afasia e movimentos coreoideais 27.8%

Visão turva, fotofobia e diplopia 22.7%

Estado alterado de consciência: confusão, letargia ou coma

Ocorrência das manifestações clínicas em paciente com infecção do SNC. Adaptado por (ACOSTA,2017) de WILLIAMSON et al., 2016 e GOMEREP et al., 2010).

Além da infecção no SNC, a criptococose pode se manifestar em nível pulmonar. Uma pequena pneumonia focal é desenvolvida, que pode ser ou não sintomática. Esta apresentação clínica é variável, uma vez que certas cepas criptocócicas podem ser mais virulentas do que outras. Também é importante mencionar que a resposta inflamatória

sistêmica varia de um paciente para outro (GUY et al., 2012). Os pacientes infectados pelo HIV/Aids, com criptococose pulmonar, podem apresentar sinais e sintomas descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Sinais e sintomas associados criptococose pulmonar

Febre (84%)

Tosse (63%)

Dispnéia (50%)

Perda de peso (47%)

Outras manifestação de menor frequência: dor pleurítica, hemoptise, rales ou esfrega pleural.

Ocorrência das manifestações clínicas em paciente com infecção pulmonar. Adaptado por (ACOSTA, 2017) de WILLIAMSON et al., 2016 e GOMEREP et al., 2010).

2.6 Tratamento da criptococose e sensibilidade aos antifúngicos em cepas de *Cryptococcus spp*

Os pacientes que são coinfectados com HIV/AIDS e *C. neoformans*, o objetivo terapêutico pode ser diferente daqueles pacientes com infecção criptocócica sem complicações por infecção por HIV/AIDS. Para infecções criptocócicas em pacientes com infecção concomitante de HIV/AIDS com uma contagem de CD4 inferior a 200 células/ μ L, o objetivo terapêutico é controlar a infecção aguda, seguida de uma terapia de supressão ao longo da vida. Para pacientes infectados pelo HIV/AIDS que concluíram com sucesso a terapia inicial, que permanecem livres dos sintomas da doença criptocócica e reconstituem sua contagem de CD4 superior a 200 células/ μ L por mais de seis meses, algumas autoridades sugerem que a terapia supressiva pode ser descontinuada. No entanto, se a contagem de CD4 do paciente cai para menos de 200 células/ μ L, a terapia supressora deve ser reinstituída (KAPLAN; MASUR; HOLMES, 2002).

Os pacientes com doença criptocócica, não complicada pela infecção por HIV/Aids, têm como objetivo terapêutico conseguir a cura permanente da infecção

fúngica, de modo que não seja necessária uma terapia supressiva crônica. Pacientes com aids e meningite criptocócicas representam mais de 80% dos pacientes com criptococose. Os principais agentes antifúngicos utilizados para o tratamento da meningoencefalite criptocócica incluem anfotericina B desoxicolato, por via intravenosa, ou formulações lipídicas, flucitosina e fluconazol orais (SPANAKIS; APERIS; MYLONAKIS, 2006).

Para a maioria dos pacientes, as preparações lipossômicas de anfotericina B são preferidas para minimizar o risco de toxicidade renal e melhorar a capacidade de dar um período ininterrupto de indução do tratamento. Os antifúngicos de equinocandinas não possuem atividade significativa contra *C. neoformans* e não devem ser usados para tratar esta infecção (SPANAKIS; APERIS; MYLONAKIS, 2006). Muitas autoridades recomendam um curso inicial de tratamento agressivo. Inicialmente, deve-se administrar anfotericina B a 0,7-1 mg/kg/dia por duas semanas; depois, mais duas semanas de flucitosina a 100 mg/kg/dia, divididas em 4 doses, seguida de fluconazol a 400 mg/dia, de oito a dez semanas no mínimo.

A adição de flucitosina à anfotericina B resulta na depuração mais rápida de levedura viável do LCR em relação à observada com anfotericina B (AMB) isolada ou a anfotericina B mais fluconazol (FCZ). A análise teve como base o informe de que a terapia combinada com anfotericina B e flucitosina é fungicida (conduz à morte celular), enquanto que o fluconazol sozinho é apenas fungistático (isto é, inibe sem matar). Esta investigação é importante porque o uso de um regime fungicida, durante a fase inicial da terapia, tem sido associado a resultados clínicos melhores. No entanto, os pacientes podem ser tratados com sucesso sem a adição de flucitosina (e sua potencial toxicidade).

O potencial tóxico da flucitosina aumenta em pacientes com disfunção renal de qualquer causa. Estudo realizado em 2016 sobre pacientes com meningite criptocócica associada a Aids verificou que a adição de dexametasona, corticoide usado para diminuir a inflamação, não reduziu a mortalidade, além de estar associada a eventos adversos e à incapacidade de uma depuração mais lenta do *Cryptococcus* do LCR (BEARDSLEY et al., 2016; BICANIC et al., 2006; KAPLAN; MASUR; HOLMES, 2002; SPANAKIS; APERIS; MYLONAKIS, 2006).

Atualmente, no Brasil, não é encontrado flucitosina disponibilizado para uso clínico, tendo como única opção de tratamento a anfotericina B associada a fluconazol. Em pacientes com infecção por HIV/AIDS, que ainda não estão em terapia antirretroviral, iniciar o tratamento para meningite criptocócica antes da terapia antirretroviral pode reduzir o risco de síndrome inflamatória de reconstituição imune (IRIS) (LORTHOLARY et al., 2005). A terapia inicial somente deverá ser considerada bem-sucedida após a cultura do LCR e confirmação negativa para *Cryptococcus* spp., e, ainda, o paciente apresentar melhora clínica significativa.

A susceptibilidade das cepas de fúngicas foi estudada e padronizada nos Estados Unidos de América, pelo Instituto de Padrões Clínicos e de Laboratório (CLSI), e na Europa, pelo Comitê Europeu de Testes de Susceptibilidade aos Antimicrobianos (EUCAST). O CLSI estuda vários antifúngicos contra *Cryptococcus* spp. no protocolo M27 suplemento A3, mas o EUCAST estuda sensibilidade para cepas de *Candida* spp. e *Aspergillus* spp.

As metodologias utilizadas para susceptibilidade *in vitro* incluem disco-difusão, macro e microdiluição em caldo. Recomenda-se o uso da microdiluição em caldo porque essa técnica ajuda a obter a concentração mínima inibitória de crescimento (MIC), sendo a concentração mínima de droga que consegue inibir o crescimento do microrganismo em condições padronizadas de meio, temperatura, tempo, etc. Os protocolos EUCAST e CLSI usam a técnica de microdiluição. O estudo realizado por Alastruey-Izquierdo et al. (2015) comparam os testes de susceptibilidades antifúngica, na Tabela 3, em que são especificadas as principais diferenças (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2015).

Tabela 3 - Comparação para testes de susceptibilidade por microdiluição

	CLSI M27-A3	EUCAST Edef 7.2
Técnica	microdiluição	microdiluição
Forma do fundo da placa	Fundo em U	Fundo chato
Meio	RPMI 1640	RPMI 1640
Conteúdo de glicose	0.2 g	2 g
Tamanho de inóculo	0.5-2.5 x 10 ³	0.5-2.5 x 10 ⁵
Temperatura de incubação	35 °C	35 °C
Tempo de incubação		
AMB, FCZ	24 horas	24 horas
Azoles	48 horas	48 horas
Parâmetros para Análise de <i>Cryptococcus</i> spp.		
<i>Cryptococcus</i>	72 horas	48 horas
Leitura	Visual	espectrofotometria
AMB	Inibição 100%	Inibição 90%
Azoles	Inibição 50%	Inibição 50%

Comparação entre CLSI e EUCAST na sensibilidade por microdiluição. AMB = anfotericina B, FCZ = fluconazol, RPMI = *Roswell Park Memorial Institute médium*. Adaptado por (ACOSTA, 2017) de ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2015.

Diferentes estudos têm sido desenvolvidos para investigar a susceptibilidade *in vitro* das cepas de *Cryptococcus* spp. a partir de amostras clínicas (BEJAR et al., 2015; HAGEN et al., 2016). Pesquisadores mostraram que os pontos de corte de resistência, estabelecidos para o gênero *Candida*, podem ser válidos para uso em ensaios de resistência a fármacos em *Cryptococcus* spp. (CLSI, 2012; JESSUP et al., 1998). No protocolo M27-S4, para susceptibilidade de leveduras do CLSI (2012), têm sido atualizados os pontos de corte para o gênero *Candida*. Um ponto de corte (ou, no inglês, “breakpoint”) é uma concentração escolhida ($\mu\text{g/ml}$) de um antibiótico que define se uma espécie de microrganismo é suscetível ou resistente ao antibiótico (CLSI, 2012).

Para os estudos apresentados aqui, utilizamos os pontos de corte de fluconazol mais antigos, que se mostraram relevantes para *Cryptococcus*: MIC $\leq 8 \mu\text{g/ml}$, como suscetíveis; 16 $\mu\text{g/ml}$ a 32 $\mu\text{g/ml}$ como dependentes da dose e suscetíveis; e $\geq 64 \mu\text{g/ml}$,

como resistentes. Para a anfotericina B, o ponto de ruptura do MIC para susceptibilidade é ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$ (CLSI, 2008). Atualmente, tem sido relatado resistência a fluconazol em cepas clínicas de *Cryptococcus* spp. (TAYLOR-SMITH; MAY, 2016). Porém, um estudo no Brasil apresenta uma alta taxa de resistência à anfotericina B (> 1 $\mu\text{g/ml}$), incluindo 40% dos isolados para *C. gattii* e 12% dos isolados de *C. neoformans* (LOZANO-CHIU et al., 1998). Sendo estes dois medicamentos os únicos disponíveis no Brasil para o tratamento da criptococose, fica evidente a importância dos estudos para detectar cepas resistentes.

Novas opções terapêuticas têm sido estudadas, além das drogas clássicas no tratamento da criptococose, como, por exemplo: VT-1129, um inibidor de síntese de ergosterol, que mostra boa penetração do SNC e é fungicida em modelos de camundongos (BRAND et al., 2016); arlyamidine T-2307, que tem como alvo a membrana mitocondrial fúngica, e é um composto injetável fungicida que mostra eficácia comparável à AMB em modelos com ratos infetados (NISHIKAWA et al., 2017); sertralina, usada como antidepressivo, mostrou uma atividade na inibição da síntese proteica e diminuiu a carga de *Cryptococcus* associada a AMB (TREVINO-RANGELL et al., 2016); tamoxifeno, como ação no metabolismo do cálcio, atua na calmodulina, com efeito fungicida associado à FCZ (BUTTS et al., 2014).

Os inibidores da bomba de prótons têm sido associados a um efeito na inibição da melanogênese em melanócitos (BAEK; LEE, 2015; MATSUI et al., 2015). A melanina é um importante fator de virulência em cepas de *Cryptococcus* spp. (NOSANCHUK; STARK; CASADEVALL, 2015). Atualmente, existem poucas drogas relatadas na literatura científica na modulação de melanina em *Cryptococcus neoformans*, apesar de ser um fator crucial na patogênese, já que cepas mutantes deficientes de *LAC1* são avirulentas (EISENMAN et al., 2007). Em vista disso, o estudo de drogas capazes de inibir a produção de melanina poderia estar associada a uma diminuição na patogênese e disseminação em doentes infectados por *Cryptococcus* spp. Para desenvolver estes estudos, são necessárias metodologias eficientes na quantificação de melanina, de modo a permitir uma avaliação rápida e confiável dos efeitos na modulação da melanina. Por isso, o presente trabalho se concentrou no desenvolvimento de uma metodologia capaz de medir a produção de melanina por meio da escala de cinza e os efeitos na modulação de melanina em cepas de *Cryptococcus* spp.

3 HIPÓTESES

- ✓ A produção de melanina, em cepas de *Cryptococcus* spp., pode ser avaliada mediante metodologia eficiente, em meio sólido, com o auxílio da escala de cinza que permite uma semiquantificação confiável.
- ✓ Os inibidores da bomba de prótons inibem o crescimento *in vitro* de cepas de *Cryptococcus* spp.
- ✓ Os inibidores da bomba de prótons, com base nos estudos em melanócitos, impossibilitam a produção de melanina em *Cryptococcus* spp.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a produção de melanina em cepas, de importância clínica de *Cryptococcus neoformans/gattii lato sensu*, e o efeito dos inibidores de bomba de prótons na inibição da melanogênese.

4.2 Objetivos específicos.

- ✓ Padronizar um método alternativo para produção e quantificação indireta de melanina, por meio da escala de cinza, em *C. neoformans lato sensu* e *C. gattii lato sensu*;
- ✓ Testar os inibidores da bomba de prótons na sensibilidade in vitro de *Cryptococcus spp*;
- ✓ Quantificar a produção de melanina em cepas, de *C. neoformans lato sensu* e *C. gattii lato sensu*, expostas e não expostas a inibidores da bomba de prótons.

5 MATERIAL E METODOS

5.1 Local do estudo

Esse estudo foi conduzido no Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).

5.2 Microrganismos utilizados.

Neste estudo, foram empregados isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans latu sensu* (n=13) e *C. gattii latu sensu* (n=7). Todas as cepas pertencem à micoteca do CEMM, onde estão mantidas a 4 °C em solução salina a 0,9%. As cepas foram repicadas em ágar semente de níger e armazenadas em estufa por 48 horas a 35°C para verificação da ausência de contaminação. Uma cepa *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi utilizada como controle nos experimentos de sensibilidade antifúngica e no controle negativo de produção de melanina no experimento de quantificação de melanina na escala de cinza. Uma cepa de *Hortaea werneckii* foi usada como controle de produção de melanina no experimento de quantificação de melanina na escala de cinza. A manutenção das cepas foi realizada com repiques, em tubos de ensaio, contendo Ágar Batata (Himedia®), as quais eram incubadas por 48 horas a 35°C antes de cada experimentação. O quadro 1 apresenta a relação das cepas empregadas na pesquisa, bem como suas características de identificação e origem de isolamento.

Quadro 1 - Identificação, espécie, genótipo, fenótipo e origem de isolamento das cepas de *Cryptococcus spp.*, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Hortaea werneckii*

Cepa			Espécie Fúngica	Genótipo	Melanina em NSA	Urease	Origem
#	Interno	CEMM					
1	Crn1		<i>C. deuterogattii</i>	VGII	+	+	Clínico
2	Crn2		<i>C. neoformans</i>	VNI	+	+	Clínico
3	Crn3		<i>C. neoformans</i>	VNI	+	+	Animal
4	Crn4		<i>C. neoformans</i>	VNI	+	+	Animal
5	Crn5		<i>C. neoformans</i>	VNI	+	+	Clínico
6	Cpf59		<i>C. gattii stricto sensu</i>	VGI	+	+	Clínico
7	Cpf60		<i>C. deuterogattii</i>	VGII	+	+	Clínico
8	Cpf61		<i>C. deuterogattii</i>	VGII	+	+	Ambiental
9	Cpf62		<i>C. deuterogattii</i>	VGII	+	+	Clínico
10	Cr6		<i>C. neoformans</i>	VNI	+	+	Clínico
11	Cr7		<i>C. neoformans</i>	VNI	+	+	Clínico
12	Cr8		<i>C. neoformans</i>	VNI	+	+	Clínico
13	Cr9		<i>C. deuterogattii</i>	VGII	+	+	Ambiental
14	Cr10		<i>C. deuterogattii</i>	VGII	+	+	Clínico
15	Cr11		<i>C. neoformans</i>	VNI	+	+	Clínico
16	Cr12		<i>C. neoformans</i>	VNI	+	+	Clínico
17	Cr12		<i>C. neoformans</i>	VNI	+	+	Clínico
18	Cr13		<i>C. neoformans</i>	VNI	+	+	Clínico
19	Cr14		<i>C. neoformans</i>	VNI	+	+	Clínico
20	Cr15		<i>C. neoformans</i>	VNI	+	+	Clínico
21	<i>Candida</i>		<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	-	-	-	STOCK CEMM
22	<i>Hortaea werneckii</i>		<i>Hortaea werneckii</i>	-	-	-	STOCK CEMM

Identificação, espécie, genótipo, fenótipo e origem de isolamento das cepas usadas no estudo. NSA ágar semente de níger.

5.2 Desenho experimental

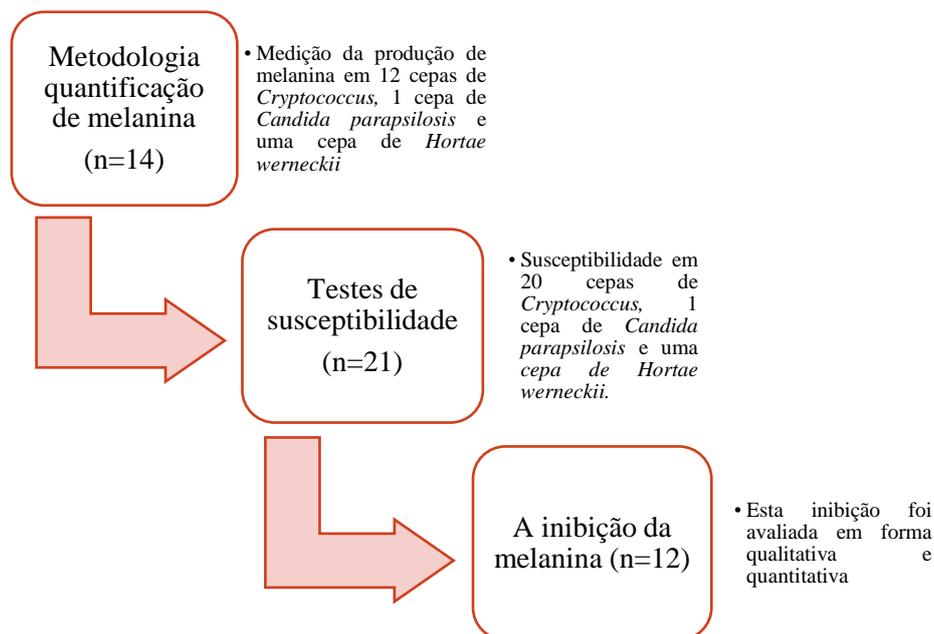
No presente estudo, medimos a produção de melanina em cepas de *C. neoformans lato sensu* e *C. gattii lato sensu*. Pelas dificuldades na mensuração da melanina com as técnicas existentes, foi desenvolvida uma nova metodologia semiquantitativa por meio da análise na escala de cinza. As cepas de *Cryptococcus spp.*

foram avaliadas por essa metodologia para conhecer o comportamento na produção de melanina por meio da escala de cinza com modificações, já usado nos estudos de Cunha et al., (2010), em que se avaliou o crescimento fúngico com o software ImageJ mediante referida escala.

A sensibilidade de cepas planctônicas de *Cryptococcus* spp. foi, posteriormente, realizada com os seguintes fármacos: omeprazol, esomeprazol, rabeprazol, pantoprazol, lansoprazol e glifosato. A solução estoque foi diluída em solução de DMSO estéril, com concentração final de 40 mg/mL. Alíquotas da solução estoque foram armazenadas a – 20 °C até o momento do experimento. Analisou-se o efeito na susceptibilidade de anfotericina B e fluconazol, segundo as recomendações do protocolo M27-A3 do CLSI, em células planctônicas de *Cryptococcus* spp., por microdiluição em caldo, como controle dos testes de sensibilidade. O objetivo da sensibilidade para os IBPs e glifosato foi encontrar a concentração mínima inibitória em cepas de *Cryptococcus* spp. Em seguida, doses subinibitórias foram usadas para avaliar o efeito na melanogênese dos IBPs e glifosato.

Finalmente, foi feito um piloto em placas de Petri, avaliando-se a inibição da melanina de forma qualitativa com omeprazol em doses subinibitórias. Depois, observou-se o efeito inibitório sobre a produção de melanina e, em seguida, avaliou-se a inibição da produção da melanina de forma quantitativa. Doses subinibitórias de IBPs e de glifosato foram testadas frente às cepas previamente avaliadas na produção de melanina. Estas cepas foram analisadas com a metodologia desenvolvida neste estudo por meio da escala de cinza. Um esquema do desenho experimental está representado na Figura 9.

Figura 9 - Organograma das principais etapas experimentais do estudo



Descrição das etapas neste experimento: A) produção e quantificação da produção de melanina, B) avaliação da sensibilidade dos IBPs, glifosato, anfotericina B e fluconazol frente às cepas de *Cryptococcus* spp., C) avaliação do efeito na melanogênese dos IBPs e glifosato.

5.3.1 Método alternativo para a análise da produção de melanina em cepas de *Cryptococcus neoformans lato sensu* e *Cryptococcus gattii lato sensu*

Oito cepas de *C. neoformans* genótipo VNI e três de *C. gattii* (2 *C. gattii stricto sensu* VGI; 1 *C. deuterogattii* VGII) foram utilizados neste estudo. O genótipo das cepas testadas foi determinada por meio de ensaio de polimorfismo de fragmentos de restrição de comprimento (RFLP), como é recomendado por Velegraki et al. (2001). Uma cepa *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e um isolado clínico de *Hortaea werneckii* foram incluídos como controle negativo e positivo para a melanização, respectivamente. As cepas foram obtidas a partir da coleção de fungos do CEMM da Universidade Federal do Ceará, Brasil. Todas as cepas foram conservadas em ágar batata à temperatura ambiente de 28 °C, com subcultura frequente para manter a sua viabilidade.

Inicialmente, as doze cepas de *Cryptococcus* spp. foram cultivadas em ágar semente de níger (*Guizotia abyssinica*) (STAIB, 1962) a 35 °C, durante cinco dias, para assegurar a capacidade de produzir melanina das cepas de *Cryptococcus* spp. Como já é conhecido, este meio possui compostos fenólicos que estimulam a produção de melanina. Todas as cepas testadas apresentam colônias características de cor castanho-

escuro. Em seguida, as cepas foram cultivadas em ágar de batata, a 35 °C, durante três dias. Neste meio, o fungo apresenta novamente seu fenótipo sem produção de melanina. Os inóculos fúngicos utilizados para realizar os ensaios adicionais deste estudo foram obtidos a partir das colônias cultivadas em ágar de batata.

Ágar meio mínimo (AMM) foi preparado em duas condições: A) um mililitro de MM duas vezes concentrado (2X) foi misturado com um mililitro de ágar bacteriológico sem aminoácidos e sem glicose a uma concentração de 3%, como controle de crescimento e; B) realizaram-se as mesmas condições descritas na condição A, suplementado com 0,001 mol L⁻¹ de l-DOPA (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), para induzir a melanogênese. Condições A e B foram adicionados a diferentes poços de uma placa de 24 poços, com um volume final de 2 ml por poço. Em seguida, 100 µl de inóculo fúngico, a uma turbidez 3 na escala de McFarland, contendo aproximadamente 9,0 x 10⁸ células por ml, foram adicionadas a dois poços da condição A e dois poços da condição B, sendo feito o experimento em duplicata. As placas foram incubadas a 35 °C durante sete dias.

Uma fotografia de cada placa foi realizada diariamente, desde o terceiro até o sétimo dia de incubação, dentro de uma câmara fotográfica preparada para este experimento, que teve uma iluminação indireta uniforme por LED 15W. A câmera fotográfica foi colocada dentro da filmadora, a uma distância de 25 cm da placa de 24 poços. A câmera Nikon D3300 foi utilizada em condições padronizadas (F/8, tempo de exposição 1/250, ISO 200, abertura máxima 4.6, distância focal 40 mm). É importante enfatizar que as fotos foram tiradas em condições similares, com a mesma câmera, pelo mesmo fotógrafo.

As fotografias obtidas foram convertidas em imagens em escala de cinza e analisadas pelo programa de computador ImageJ, versão 1.51g (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>), que já foi aplicada para fins semelhantes (CUNHA et al., 2010). Em nosso estudo, a área de medição foi padronizada, variando de 245,000 a 246,000 pixels por poço, cujos pixels de cada poço foram quantificados na escala de cinza. A escala de cinza é uma gama de tons cinzentos, na gama de cor de branco até preto, que é medido de zero a 250, em que zero é o valor mais preto e 250, o mais branco.

Os valores obtidos mediante a quantificação de pixels na escala de cinza foram convertidos em porcentagem de preto (PP), a fim de facilitar a compreensão e a interpretação dos dados, usando a fórmula:
$$PP = \frac{250 - \text{meia na escala de cinza de cada cepa por dia}}{250 \times 100}$$
. Em seguida, a porcentagem obtida de preto foi utilizada para comparar quantitativamente a pigmentação de cada cepa por dia. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão da porcentagem de preto obtida para cada cepa, por dia de análise.

5.3.2 Sensibilidade em células planctônicas de *Cryptococcus* spp.

O teste de susceptibilidade foi desenvolvido com 20 cepas de *C. neoformans* / *C. gattii sensu latu* e uma cepa de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 em estado planctônico, por meio da técnica de microdiluição em caldo, conforme o documento M27-A3 que padroniza a sensibilidade de leveduras (CALSI, 2008). As drogas antifúngicas clássicas usadas no tratamento da criptococose, como anfotericina B (AMB) e fluconazol (FLU), foram testadas, bem como os inibidores de bomba de prontos (IBPs) e glifosato. Esta última droga foi incluída como controle da inibição da melanogênese, já que apresentou efeitos na inibição de melanina em estudos prévios (NOSANCHUK; OVALLE; CASADEVALL, 2001).

Os antifúngicos (ATF) foram testados nas concentrações preconizadas pelo documento citado anteriormente, com intervalos que variaram de 0,125 – 64 $\mu\text{g/mL}$ para FLU e 0,0313 – 16 $\mu\text{g/mL}$ para AMB. Os IBPs e glifosato foram testados em concentrações que variaram de 1,15 – 1000 $\mu\text{g/mL}$ (KÜÇÜKASLAN et al., 2013).

Os isolados foram previamente semeados em ágar batata e incubados em estufa a 35°C por 48 horas. Foi preparado um inóculo das leveduras em solução salina estéril (0,85% NaCl), ajustando a turbidez da suspensão à escala 0,5 de McFarland. A suspensão fúngica foi submetida à diluição de 1:50 e, posteriormente, a 1:20 em meio RPMI-1640 tamponado com 0,165 M de MOPS a pH 7,0. Alíquotas de 100 μL do inóculo final foram adicionadas às placas já contendo 100 μL de RPMI-1640, suplementadas das drogas, distribuídas em diluições seriadas decrescentes. As placas foram incubadas a 35 °C por 72 horas. As leituras dos pontos de corte das drogas foram determinadas de acordo com documento M27-A3. Para o IBPs e glifosato, os pontos de

corde foram definidos como a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento visível (MIC50), com leitura visual em 24, 48 e 72 horas.

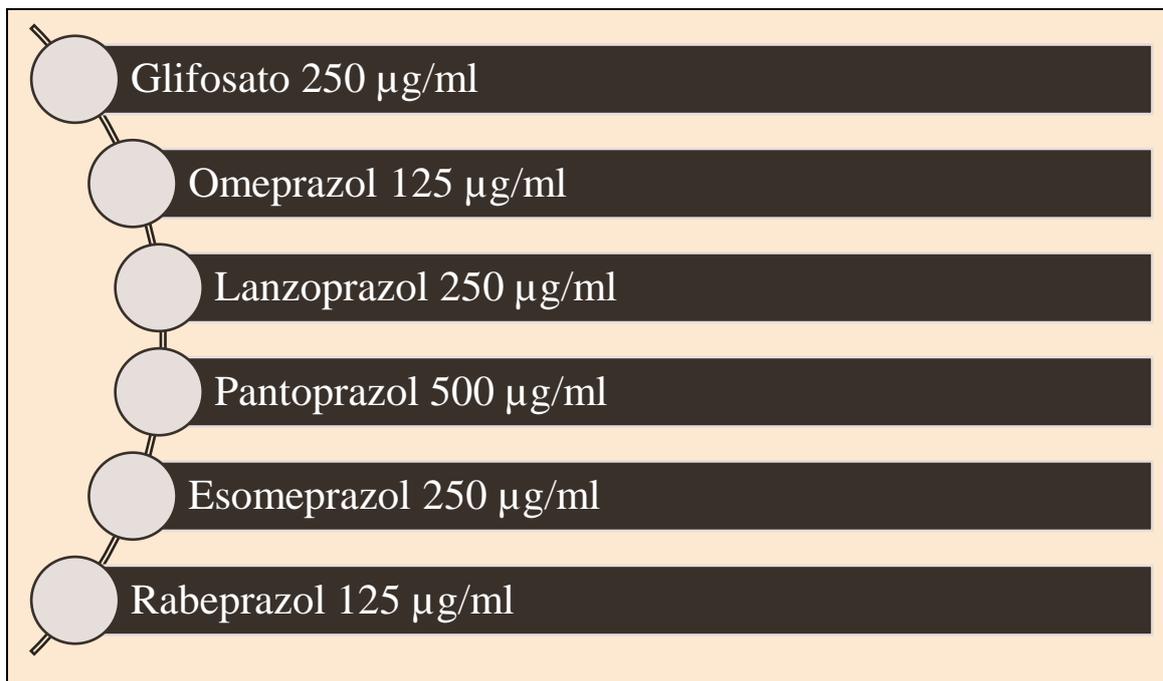
5.3.3 Inibição da melanogênese em cepas de *Cryptococcus neoformans lato sensu* e *Cryptococcus gattii lato sensu*

Inicialmente, foi feita uma análise qualitativa da capacidade de produção de melanina, baseada na metodologia de Brilhante et al. (2017), e quatro condições foram avaliadas: A) Ágar meio mínimo; B) Ágar meio mínimo suplementado com 0,001 mol L⁻¹ l-DOPA; C) Ágar meio mínimo adicionado a uma concentração de 125 µg/ml de omeprazol; D) Ágar meio mínimo suplementado com 0,001 mole L⁻¹ l-DOPA e 125 µg/ml de omeprazol. Nesta avaliação qualitativa, só foi testado omeprazol em concentrações subinibitorias.

Na condição A, avaliou-se a capacidade de crescimento em meio mínimo sólido; na condição B, serviu como controle positivo de produção de melanina; na condição C, foi controlado o crescimento do ágar suplementado com omeprazol; e na condição D, testou-se a capacidade de inibição da produção de melanina, por parte do omeprazol, pela mistura de substrato para melanogênese e omeprazol. No teste qualitativo, foram usadas onze cepas de *Cryptococcus* e uma cepa de *C. parapsilosis* ATCC 22019.

Em razão dos resultados satisfatórios na inibição da melanogênese no experimento qualitativo, baseado na metodologia de produção de melanina com a metodologia descrita por Brilhante et al. (2017), foi avaliada a capacidade de inibição de melanina de omeprazol,esomeprazol, lansoprazol, rabeprazol, pantoprazol e glifosato como controle de inibição da melanogênese. Numa placa de 24 poços por cepa, foi avaliado: condição A, meio mínimo com 0,001 mole L⁻¹ l-DOPA, como positivo para produção de melanina; condição B, meio mínimo mais IBP, como controle de crescimento nas concentrações subinibitórias usadas; condição C, meio mínimo suplementado com IBP e 0,001 mol L⁻¹ l-DOPA, para avaliar a capacidade inibitória da melanogênese por parte dos IBPs. As doses testadas das drogas são descritas na Figura 10.

Figura 10 - Doses subinibitórias utilizadas no experimento qualitativo e quantitativo de inibição da melanogênese



O inóculo das 12 cepas de *Cryptococcus*, testadas previamente na produção de melanina, foi feito em meio mínimo líquido estéril, com uma turbidez atingindo três na escala McFarland, com aproximadamente 9×10^8 células/mL, sendo que 200 μl foram colocados em duplicata nas condições A, B e C do experimento quantitativo. Após a incubação em estufa a 35°C , por sete dias, a partir do terceiro dia, em condições padronizadas, duas fotografias foram tiradas de cada uma das placas. A produção de melanina foi quantificada por meio da escala de cinza, mediante programa ImageJ e, em seguida, usando a fórmula previamente descrita transformada a percentagem de preto, os resultados são descritos na seção de resultados.

5.4 Testes estatísticos

Os dados da produção melanina e inibição da melanogênese, no experimento quantitativo, foram analisados por meio da avaliação de variância unidirecional de Friedman e Kruskal-Wallis, seguida do teste de postura de Dunn, realizado com o software GraphPad Prism sete (7), versão 1,51 g, CA, EUA. Os valores de P, inferiores a 5%, indicaram conclusões significativas.

6 RESULTADOS

6.1 Método alternativo para a análise da produção de melanina em cepas de *Cryptococcus neoformans lato sensu* e *Cryptococcus gattii lato sensu*

Os dias um e dois não foram analisados porque o crescimento fúngico e a produção de melanina não eram adequados, portanto, as fotográficas foram feitas desde o terceiro até o sétimo dia. As cepas de *Cryptococcus* spp., na condição A, apresentaram as medidas mais baixas dos microrganismos testados nesta condição, com valores significativamente menores de porcentagem de preto ($P < 0,05$), variando de $36,1 \pm 4,0$ a $39,2 \pm 2,2$ ao longo dos dias analisados. Já nas cepas *Cryptococcus* spp., sob a condição B, as colônias foram significativamente mais escuras ($P < 0,05$) do que as cultivadas sob a condição A, começando logo no terceiro dia. A porcentagem de preto das cepas analisadas variava de $62,9 \pm 8,4$ a $80,8 \pm 2,8$ durante os dias testados (Tabela 6 e Figura 12). A produção de melanina variou de acordo com cada cepa, mas todas as cepas produziram pigmento. As cepas de *Cryptococcus* spp. apresentaram um aumento significativo da pigmentação ao longo dos dias fotografados ($P < 0,05$), cultivada sob a condição B, como mostra a Tabela 6 e a Figura 12.

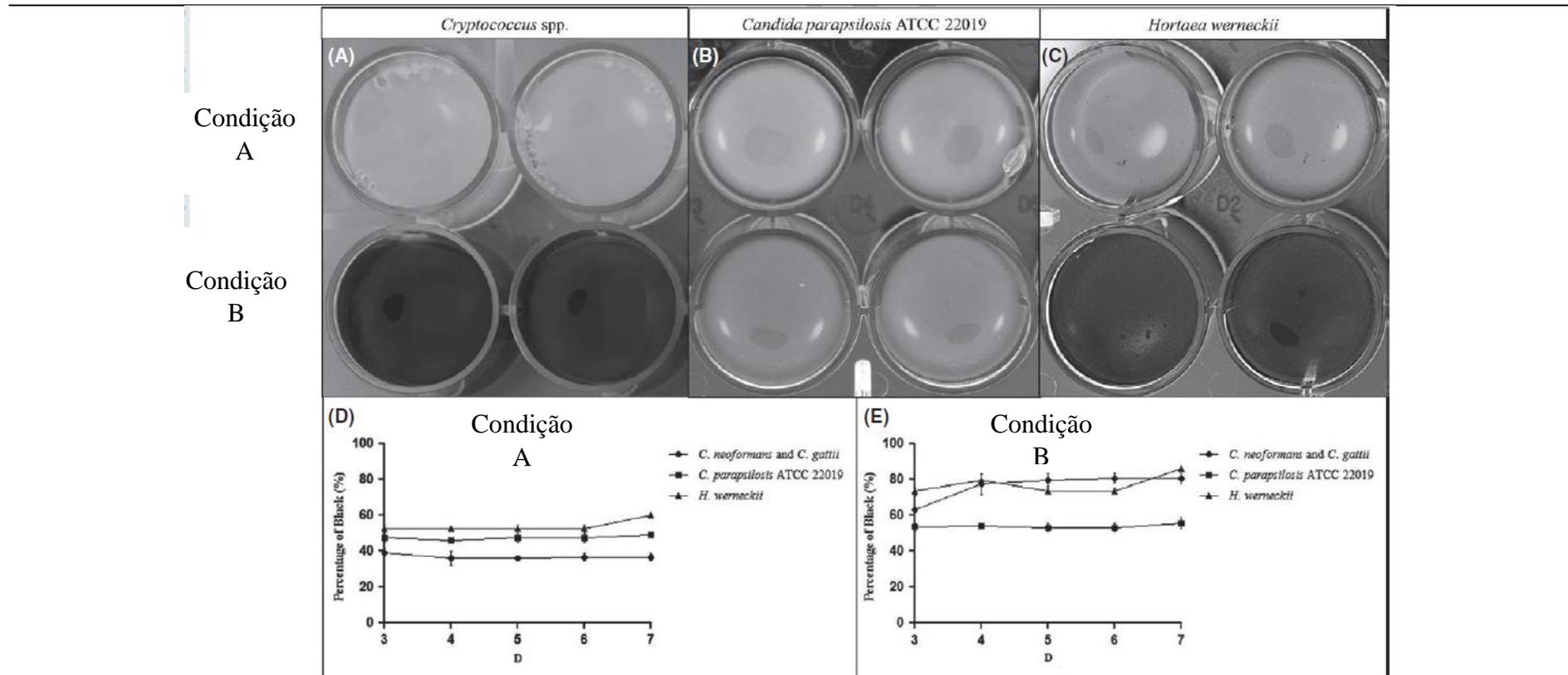
A *C. parapsilosis* ATCC 22019, um dos fungos causadores da Candidíase, foi utilizado como controle negativo de pigmentação, atingindo valores de porcentagem de preto variando de $46,3 \pm 1,4$ a $49,3 \pm 1,0$ e de $53,3 \pm 2,1$ a $55,7 \pm 3,2$ nas condições A e B, respectivamente. *H. werneckii* foi usado como controle positivo de pigmentação, porém, não mostrou crescimento satisfatório na condição A, apresentando uma porcentagem de preto variando de $52,4 \pm 2,0$ a $60 \pm 0,4$ para os dias estudados. Sob a condição B, as colônias foram bem cultivadas, obtendo uma porcentagem de preto variando de $73,4 \pm 1,6$ a $86,0 \pm 0,6$. Os dados sobre a porcentagem de preto foram analisados para o período de sete dias. A pigmentação de *Cryptococcus* spp., sob a condição B, foi significativamente maior ($P < 0,05$) do que o obtido para *C. parapsilosis* ATCC 22019, mas com dados semelhantes aos obtidos por *H. werneckii*.

Tabela 4 - Produção de melanina por *Cryptococcus* spp. (N = 12) em ágar médio mínimo sem e com L-DOPA do terceiro até o sétimo dia de crescimento

Cepas	Condição A					Condição B				
	Porcentagem de preto (meia \pm DS) por dia de crescimento									
	3	4	5	6	7	3	4	5	6	7
<i>Cryptococcus</i> spp.	39.2 \pm 2.2a	36.1 \pm 4.0a	36.0 \pm 1.2a	36.7 \pm 1.9a	36.8 \pm 1.5a	62.9 \pm 8.4a	77.3 \pm 6.0b	79.8 \pm 3.5b	80.8 \pm 2.8b	80.8 \pm 1.8b
<i>C. parapsilosis</i>	47.6 \pm 2.4a	46.3 \pm 1.4a	47.6 \pm 2.3a	47.6 \pm 2.3a	49.3 \pm 1.0a	53.4 \pm 2.2a	54.3 \pm 1.2a	53.3 \pm 2.1a	53.3 \pm 2.1a	55.7 \pm 3.2a
<i>H. werneckii</i>	52.4 \pm 2.0a	52.5 \pm 1.3a	52.4 \pm 2.1a	52.4 \pm 2.1a	60.0 \pm 0.4a	73.4 \pm 1.6a	79.6 \pm 0.5a	73.5 \pm 1.5a	73.5 \pm 1.5a	86.0 \pm 0.6b

Condição A: ágar médio mínimo sem L-DOPA; Condição B: ágar médio mínimo com L-DOPA; *Candida parapsilosis* ATCC 22019: controle negativo produção de melanina; *Hortaea werneckii*: controle positivo para produção de melanina. A porcentagem de preto, esta expressado em média \pm desvio padrão, foi calculada a partir da quantificação de pixels obtidos a partir das imagens analisadas na escala de cinza das colônias de fungos estudadas, desde o terceiro até o sétimo dia de crescimento. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (P <0,05) na produção de melanina (porcentagem de preto) de *Cryptococcus* spp., *C. parapsilosis* e *H. werneckii*, ao longo do período de análise. Adaptado de BRILHANTE, ESPAÑA, ALENCAR, et al., 2017.

Figura 11 - Análise da produção de melanina em cepas *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii lato sensu*



Análise da produção de melanina em cepas *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii lato sensu* no meio mínimo com e sem L-DOPA (A, B *Candida*, C *Hortaea werneckii*) representativas das colônias de fungos cultivados sob condições A, ágar meio mínimo (MM) sem L-DOPA, e condição B, ágar MM com L-DOPA, no quarto dia de crescimento. Imagens semelhantes foram obtidas para todas as cepas testadas, a partir do terceiro ao sétimo dia de crescimento, a fim de analisar a pigmentação da colônia na escala de cinza mediante a quantificação pelo software ImageJ; (D e E) Percentagem de preto obtido para *C. neoformans* (N = 8) e *C. gattii lato sensu* (n = 3), *Cândida parapsilosis* ATCC 22019 e *Hortaea werneckii*, após crescimento em condições de A (D) ou condição B (E), a partir do terceiro ao sétimo dia de crescimento. Adaptado de BRILHANTE, ESPAÑA, ALENCAR, et al., 2017

6.2 Sensibilidade em células planctônicas de *Cryptococcus* spp.

Baseado no protocolo do CLSI, para sensibilidade de leveduras, documento M27-A3, foi avaliada, em duplicata, a sensibilidades de 20 cepas de *Cryptococcus* spp. (Tabela 5) e uma cepa de *C. parapsilosis* ATCC 22019 como controle do teste de sensibilidade (Tabela 6). As placas de 96 poços foram lidas de forma visual para AMB, uma inibição de 100% crescimento, e FLZ, uma inibição de 50% do crescimento foi obtida. No caso dos inibidores da bomba de prótons (IBPs) e glifosato, foram feitas as leituras de inibição de 50% do crescimento.

Para *C. parapsilosis*, as leituras foram feitas em 24h e 48h, com concentrações inibitórias esperadas para AMB e FCZ como é representado na Tabela 5. O objetivo da sensibilidade foi avaliar a possível atividade no crescimento de cepas de *Cryptococcus*, para usar doses subinibitorias nos ensaios de inibição da melanina.

As cepas de *Cryptococcus*, testadas com AMB, apresentaram MICs com um rango entre 0,25 até 0,5 µg/ml, na leitura de 24 horas; de 0,25 até 2 µg/ml, na leitura de 48 horas, 0,25 até 4 µg/ml, na leitura de 72 horas, sendo que, para esta leitura, nove cepas mostraram concentrações mais elevadas que 2 µg/ml. FLZ apresentou MICs de 2 até 4 µg/ml, na leitura de 24 horas; 2 até 8 µg/ml, na leitura de 48 horas, 2 até 8 µg/ml, na leitura de 72 horas. Todas as cepas mostraram concentrações de FCZ ≤ 8 µg/ml na leitura de 72 horas (Tabela 4).

Dos IBPs em cepas de *Cryptococcus*, na leitura de 24 horas, rabeprazol apresentou MICs com meia geométrica de $108,3 \pm 1,54$, sendo a menor concentração comparada com os outros fármacos usados desta família. Pantoprazol mostrou MICs maiores com uma meia geométrica de $250 \pm 1,96$, sendo que a droga precisou de concentrações maiores para se conseguir uma inibição de 50% de crescimento da cepa (Figura 11A). Na leitura de 48 horas, rabeprazol continua apresentando uma melhor atividade com meia geométrica de $120,2 \pm 1,7$. Da mesma forma, pantoprazol mostrou concentrações inibitórias mais altas do grupo com meia geométrica de $993 \pm 1,2$ (Figura 11B). O omeprazol foi a melhor droga inibitória com 72 horas, mostrando uma meia geométrica de $148,7 \pm 1,3$. Já o pantoprazol continua com as concentrações mais altas com meia geométrica de $993 \pm 1,2$ (Figura 11C). Glifosato apresentou MICs altos representados na Tabela 4.

Tabela 5 - Sensibilidade para as 20 cepas de *Cryptococcus*

<i>Cryptococcus</i> spp.						
	24 horas		48 horas		72 horas	
	Intervalo de MIC em $\mu\text{g/ml}$	MG \pm DP em $\mu\text{g/ml}$	Intervalo de MIC em $\mu\text{g/ml}$	MG \pm DP em $\mu\text{g/ml}$	Intervalo de MIC em $\mu\text{g/ml}$	MG \pm DP em $\mu\text{g/ml}$
AMB	0.25-0.5	0.308 \pm 1.38	0.25-2	0.51 \pm 2.0	0.25-4	1.464 \pm 2.6
FLU	2-4	3.06 \pm 1.28	2-8	4.287 \pm 1.5	2-8	4.757 \pm 1.6
Omeprazol	125-250	143.6 \pm 1.32	125-250	143.6 \pm 1.32	125-250	148.7 \pm 1.3
Esomeprazol	125-500	203.1 \pm 1.66	125-500	233.3 \pm 1.55	125-500	203.1 \pm 1.3
Lansoprazol	61.5-250	116.3 \pm 1.47	125-1000	183.3 \pm 1.77	125-1000	196.1 \pm 1.7
Pantoprazol	125-1000	250 \pm 1.96	500-1000	993 \pm 1.2	500-1000	993 \pm 1.2
Rabeprazol	61.5-250	108.3 \pm 1.54	61.5-250	120.2 \pm 1.7	125-250	163.6 \pm 1.4
Glifosato	500-1000	933 \pm 1.238	500-1000	933 \pm 1.238	500-1000	933 \pm 1.23

Drogas usadas: AMB = anfotericina B relatado a concentração inibitória mínima para inibir 100% do crescimento; FLZ = fluconazol relatado a concentração inibitória mínima para inibir 50% do crescimento; inibidores de bomba de prótons e glifosato foram relatados a concentração inibitória mínima para inibir 50% do crescimento; MG= meia geométrica e DP desvio padrão da meia geométrica.

Figura 12 - Análise comparativa da sensibilidade em 20 cepas de *Cryptococcus*

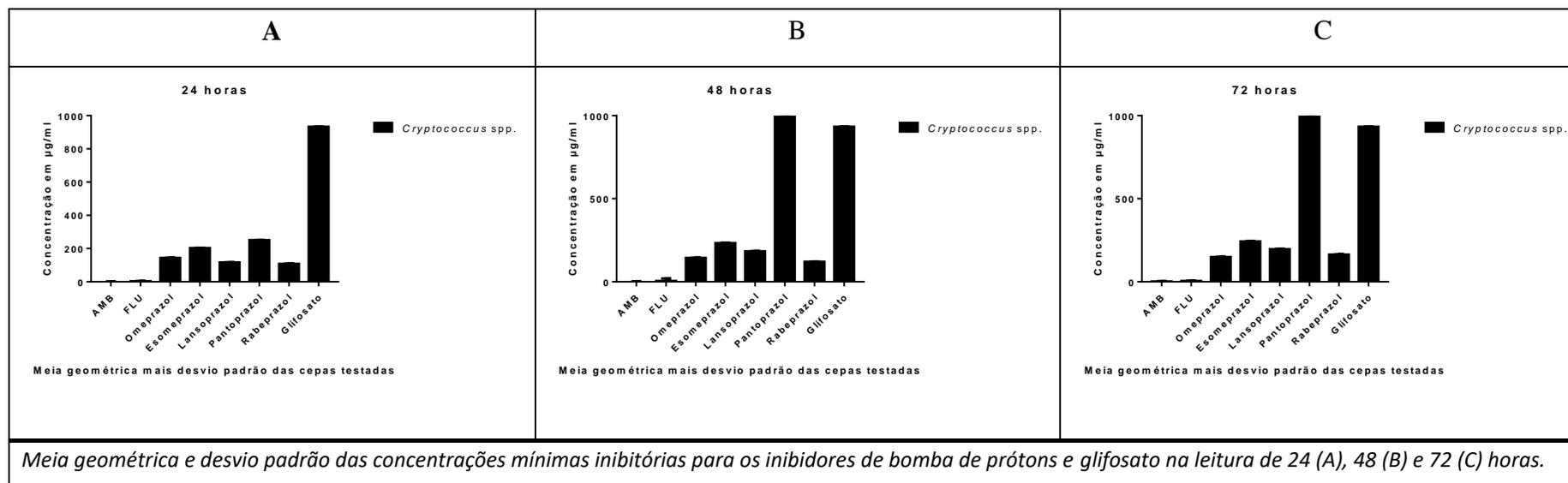


Tabela 6 - Sensibilidade para *Candida parapsilosis* ATCC 22019

	24 horas	48 horas
	MIC em µg/ml	MIC em µg/ml
AMB	0.25	0.25
FLU	2	2
Omeprazol	250	500
Esomeprazol	250	250
Lansoprazol	250	250
Pantoprazol	1000	1000
Rabeprazol	125	250
Glifosato	1000	1000

Drogas usadas: AMB = anfotericina B relatado a concentração inibitória mínima para inibir o 100% do crescimento, FLZ = fluconazol relatado a concentração inibitória mínima para inibir o 50% do crescimento, inibidores de bomba de prótons e glifosato foi relatado a concentração inibitória mínima para inibir o 50% do crescimento. MG= meia geométrica e DP desvio padrão da meia geométrica.

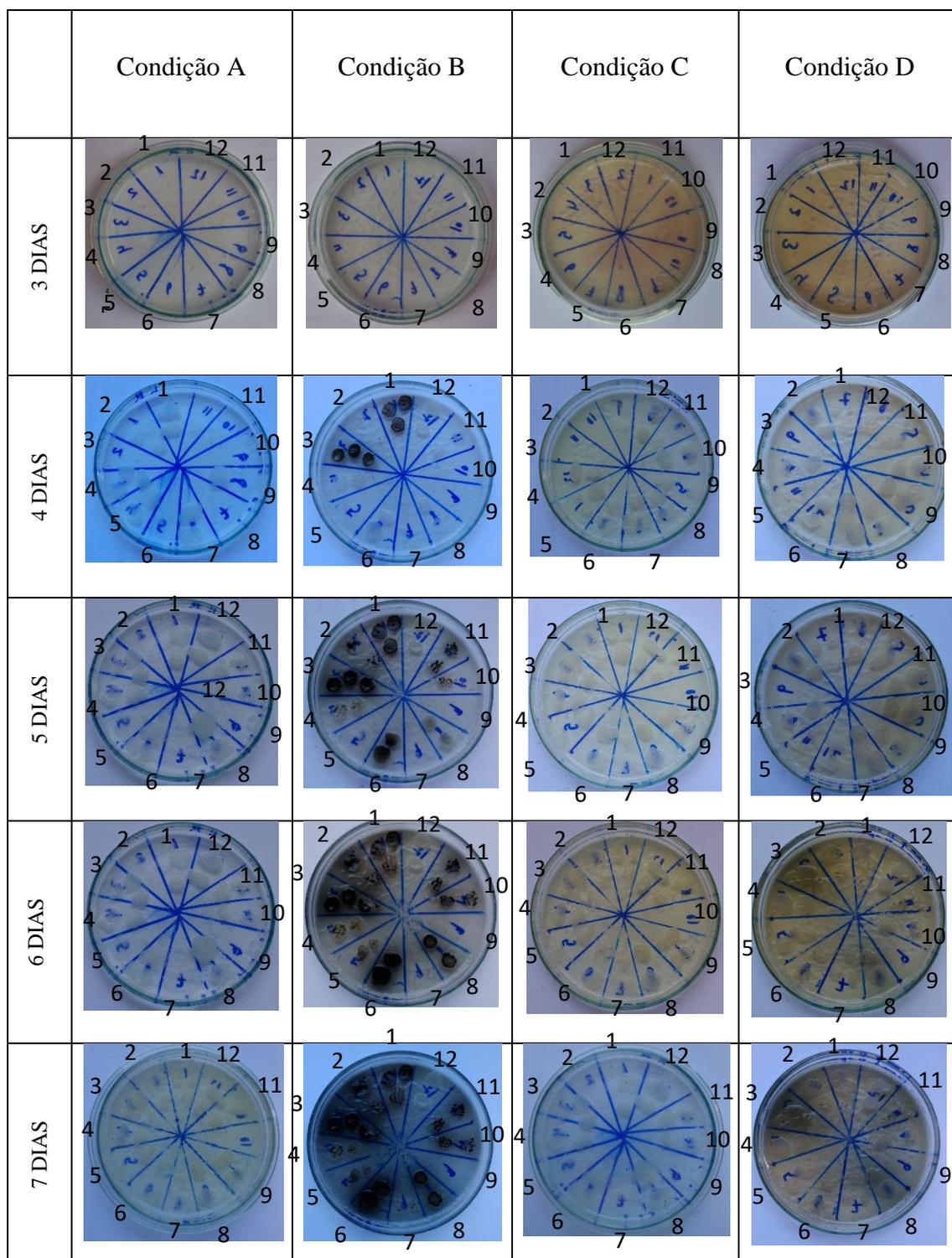
6.3 Inibição da melanogênese em cepas de *Cryptococcus neoformans lato sensu* e *Cryptococcus gattii lato sensu*

Inicialmente, testou-se omeprazol em dose de 125 µg/ml. Este experimento qualitativo foi desenvolvido em quatro condições como descrito na metodologia. As onze cepas de *Cryptococcus* apresentaram melanização na condição B; algumas cepas tiveram um aspecto mais escuro se comparadas a outras. As cepas foram numeradas de um até doze. As primeiras onze cepas foram de *Cryptococcus*, a cepa número doze foi de *Candida parapsilosis* ATCC 22019, sem produção de melanina na condição B (Figura 11). Na condição C, todas as cepas tiveram crescimento semelhante às outras condições em dose subinibitorias de omeprazol. A condição D apresentou inibição total da produção de melanina nas onze cepas de *Cryptococcus* testadas. A partir do sexto dia, as cepas dois e oito começaram uma leve produção do pigmento. As imagens do experimento qualitativo são mostradas na Figura 13.

No experimento quantitativo, a produção de melanina na condição A (com l-DOPA), as cepas apresentaram uma percentagem de preto desde 62.86 ± 8.38 no terceiro dia até 80.8 ± 2.91 no sétimo dia. As colônias serão consideradas como melanizadas com valores de percentagem de preto maior que 60. Das drogas testadas na condição C (inibitória da melanogênese), o glifosato aparentou maior inibição, com dados, no quarto dia, na média de porcentagem de preto 39.35 ± 0.94 , comparado ao controle de produção de melanina para o mesmo dia, que foi 77.59 ± 6.09 . O valor mais alto de percentagem de preto na condição C foi, em média, de 52.97 ± 1.87 para omeprazol no sétimo dia, marcando, assim, o início da produção de melanina nesta condição. Os dados da média de percentagem de preto mais o desvio padrão para as cepas testadas por dia são apresentados na Tabela 7 e na Figura 13.

Os testes de postura de Dunn, comparativamente aos testes de Friedman e Kruskal-Wallis, mostraram diferenças estatisticamente significativas, para glifosato, omeprazol, pantoprazol e lansoprazol, entre a condição A, das cepas melanizadas, e a condição C, das cepas com inibição de melanina, durante todos os dias estudados com uma $p < 0.05$ (Tabela 7).

Figura 13 - Experimento qualitativo da inibição da produção de melanina com omeprazol foram testadas em onze (11) cepas de *Cryptococcus* e uma cepa de *C. parapsilosis* ATCC 22019



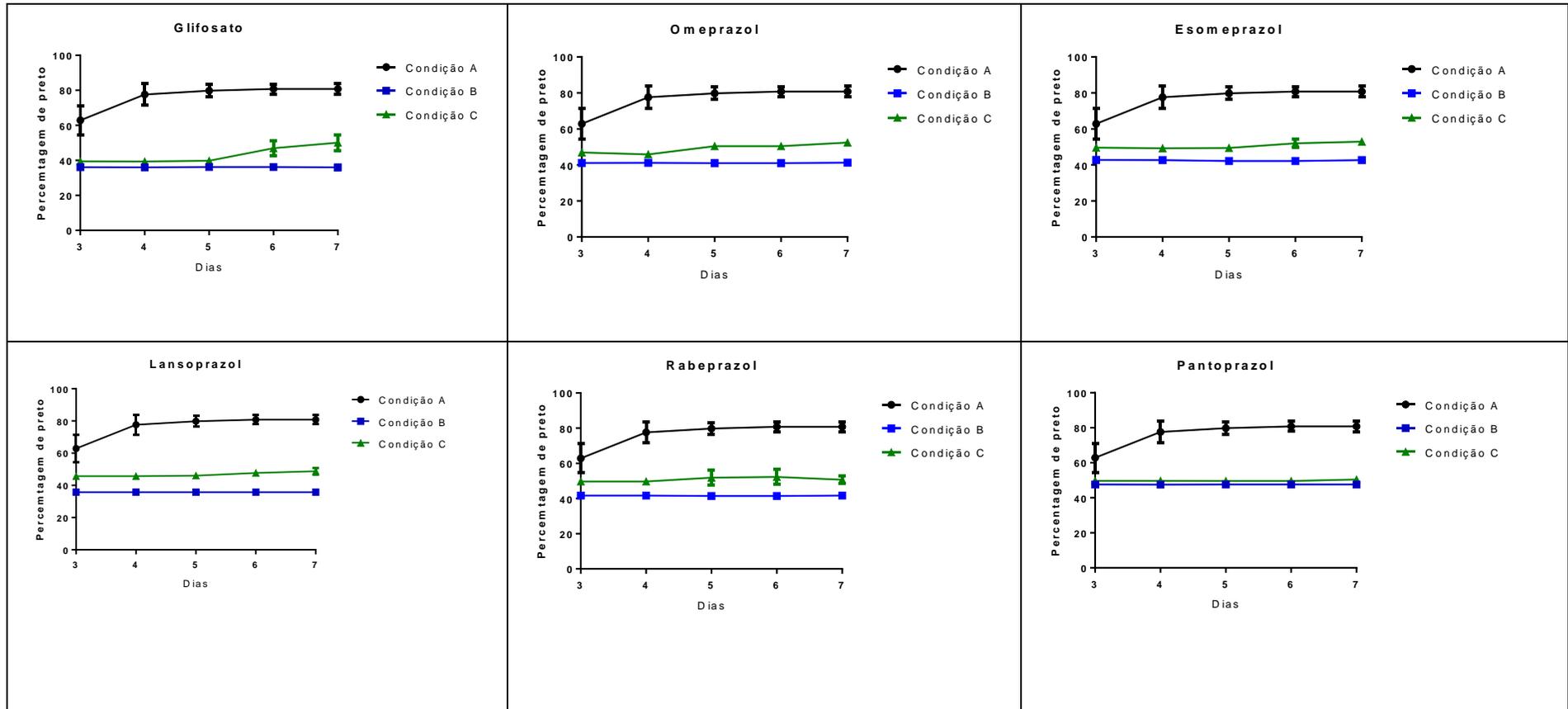
Condição A, ágar meio mínimo; condição B, ágar meio mínimo mais l-DOPA; condição C, ágar meio mínimo mais omeprazol; condição D, ágar meio mínimo suplementado com l-DOPA e omeprazol.

Tabela 7 - Experimento de inibição da melanogênese

	Condição A	Condição B						Condição C					
	l-DOPA	Omeprazol	Esomeprazol	Lansoprazol	Rabeprazol	Pantoprazol	Glifosato	Omeprazol + l-DOPA	Esomeprazol + l-DOPA	Lansoprazol + l-DOPA	Rabeprazol + l-DOPA	Pantoprazol + l-DOPA	Glifosato + l-DOPA
Dia 3	62.86 ± 8.38 a	41.16 ± 0.27	42.76 ± 0.59	35.79 ± 0.74	41.74 ± 0.53	47.61 ± 0.79	36.1 ± 0.87	46.96 ± 0.42 b	49.6 ± 0.54	45.7 ± 0.2 b	49.72 ± 0.39	49.72 ± 0.37 b	39.49 ± 0.92 b
Dia 4	77.59 ± 6.09 a	41.22 ± 0.29	42.7 ± 0.54	35.81 ± 0.52	41.72 ± 0.25	47.56 ± 0.78	36.08 ± 0.84	45.85 ± 0.33 b	49.29 ± 0.59	45.7 ± 0.4 b	49.67 ± 0.42	49.73 ± 0.43 b	39.35 ± 0.94 b
Dia 5	79.82 ± 3.528 a	41.07 ± 0.51	42.24 ± 0.62	35.75 ± 0.71	41.47 ± 0.62	47.62 ± 0.92	36.2 ± 0.78	45.75 ± 0.49 b	49.43 ± 0.51	46.03 ± 0.95 b	51.9 ± 4.14	49.66 ± 0.41 b	39.75 ± 1.08 b
Dia 6	80.81 ± 2.83 a	41.07 ± 0.51	42.24 ± 0.62	35.75 ± 0.71	41.47 ± 0.62	47.62 ± 0.92	36.2 ± 0.78	50.43 ± 0.50 b	52.08 ± 2.37	47.72 ± 1.06 b	52.33 ± 4.03	49.66 ± 0.41 b	46.94 ± 4.15 b
Dia 7	80.8 ± 2.91 a	41.26 ± 0.29	42.7 ± 0.54	35.81 ± 0.52	41.72 ± 0.25	36.59 ± 0.68	36.08 ± 0.84	52.42 ± 1.32 b	52.97 ± 1.87	48.76 ± 2.16 b	48.76 ± 2.16	50.73 ± 2.12 b	50.42 ± 4.01 b

Foram testadas 11 cepas de *Cryptococcus* para omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, esomeprazol e rabeprazol e glifosato. Os dados são expressados em média de percentagem de preto mais desvio padrão, analisados desde o terceiro até sétimo dia através da escala de cinza do programa ImageJ. Condição A meio mínimo ágar mais l-DOPA. Condição B ágar meio mínimo mais inibidor da bomba de prótons ou glifosato. Condição C ágar meio mínimo suplementado com l-DOPA e inibidor da bomba de prótons ou glifosato. As letras a e b mostram diferença estatisticamente significativa entre a condição A e condição C, resultando em inibição da produção de melanina.

Figura 14 - Experimento quantitativo da inibição da produção de melanina.



Dados expressos em média de percentagem de preto mais desvio padrão em onze cepas de *Cryptococcus* spp., analisados por meio da escala de cinza com ImageJ, desde o terceiro até o sétimo dia. Condição A, produção de melanina em ágar meio mínimo suplementado com l-DOPA; condição B, controle de crescimento (não melanizado) em meio mínimo mais a droga testada em concentração subinibitorias (IBP ou glifosato); condição C, inibição de melanina em ágar meio mínimo com l-DOPA e glifosato/IBP em doses subinibitorias.

7 DISCUSSÃO

A criptococose é uma doença com distribuição global (RAJASINGHAM et al., 2017), associada, antigamente, à infecção em pacientes com HIV/Aids. Além dessas associações, diferentes estudos demonstram que essa patologia pode afetar pessoas com outras alterações do sistema imune, bem como pacientes com transplantes e pacientes imunocompetentes (FISHER; VALENCIA-REY; DAVIS, 2016). Surto por *Cryptococcus gattii* têm sido relatados em Vancouver, podendo estar relacionados a uma provável adaptação dessa levedura ou a um possível aumento dessa patogenicidade (MACDOUGALL et al., 2007).

Na verdade, este organismo tem vários fatores de virulência para permitir a infecção e disseminação. Esta disseminação e o tropismo pelo SNC têm sido explicados pela produção de melanina por *Cryptococcus* spp. A neurocriptococose é uma condição grave com uma taxa elevada de mortalidade (KAPLAN; MASUR; HOLMES, 2002). Além disso, a dificuldade do diagnóstico precoce da doença, com a progressão da infecção no sistema nervoso central, leva a um alto índice de mortalidade (WILLIAMSON et al., 2016). Apesar dos muitos obstáculos no estudo e caracterização de melanina, devido à sua importância na patogenicidade *in vivo*, esse tema tem grande relevância na literatura científica.

Estudos mostram que a melanina produzida por *Cryptococcus* spp. tem a capacidade de: alterar as respostas de citocinas; diminuir a fagocitose e reduzir a toxicidade de peptídeos microbicidas, espécies reativas de oxigênio e antifúngicos; e desempenhar um papel significativo na resistência mecânica de *Cryptococcus* spp. (NOSANCHUK; STARK; CASADEVALL, 2015). Esta melanina é tão importante na patogênese de *Cryptococcus* que cepas, com a ruptura dos genes essenciais para a produção de melanina em *C. neoformans*, causam uma redução na disseminação do fungo (OLSZEWSKI et al., 2004) e letalidade (SALAS et al., 1996) em modelos de ratos.

Até agora, três drogas foram relatadas na inibição de melanina: voriconazol, que impede a capacidade da lacase para catalisar a formação de melanina (MARTINEZ et al., 2007); glifosato, que bloqueia a autopolimerização e a oxidação de l-DOPA e l-epinefrina (NOSANCHUK; OVALLE; CASADEVALL, 2001); e ptilomycalin A, pela inibição da lacase (DALISAY DS, SALUDES JP, 2011). Embora a melanina seja fator

importante na inibição, existem poucas drogas estudadas nesta área, de modo que, neste trabalho, foi considerada a modulação dos inibidores da bomba de prótons na melanogênese.

Os inibidores da bomba de prótons (IBPs) mostraram um efeito inibidor na melanogênese nos estudos de Matsui et al. (2015). O estudo mostra que o omeprazol e os seus congêneres, intimamente relacionados, inibem a melanogênese em concentrações micromolares em células de melanoma B16 de rato, melanócitos normais da epiderme humana e em um modelo de pele humana reconstruída (MATSUI et al., 2015). Enquanto que BAEK e LEE, (2015) mostram uma diminuição na tirosinase de cogumelo, com uma conseqüente inibição da melanogênese nos seus estudos (BAEK; LEE, 2015).

Antes dos testes na modulação da melanogênese dos IBPs, procedeu-se a quantificar a produção de melanina nas cepas testadas. Assim, verificou-se que diferentes métodos para a quantificação de melanina são amplamente utilizados e necessários para avaliar a biologia microbiana e testar novas drogas que modulam a melanina. Como mencionado acima, os métodos atuais para a quantificação de melanina são difíceis de implementar, demorados e caros, tal como o uso de microscopia eletrônica de varredura, que requer equipamento de alto custo e reagentes (RANI et al., 2012). Além disso, pode-se também realizar a extração de melanina, mas este processo pode alterar a sua composição (NOSANCHUK; STARK; CASADEVALL, 2015).

Outro método utilizado para avaliar indiretamente a produção de melanina é a quantificação espectrofotométrica da atividade de lacase, que consiste num método econômico que dá uma estimativa da produção de melanina. No entanto, é importante notar que esta atividade da enzima é variável e influenciada pela temperatura, dentre outras condições experimentais, o que pode afetar, sobremaneira, a variabilidade dos resultados (SINGHAL; CHOUDHARY; THAKUR, 2012).

O meio mínimo líquido tem sido amplamente utilizado em ensaios para induzir a produção de melanina, porém requer o processo de extração da parede fúngica antes da quantização de melanina, uma vez que não permite avaliar visualmente as diferenças na pigmentação da célula. Além disso, as colônias fúngicas não são formadas em meios líquidos, o que torna impossível uma leitura rápida qualitativa. Portanto, a nova metodologia desenvolvida no presente trabalho pode ser muito benéfica neste campo

para ajudar na avaliação qualitativa visual contínua, bem como na possibilidade de semiquantificação por meio da escala de ucinza. Essa metodologia permitiu também observar uma boa produção de melanina de *H. werneckii*, com percentagem de negro de 86%, e *Cryptococcus* spp., com uma percentagem de preto de 81%, nas cepas estudadas na condição B (L-DOPA). De acordo com o esperado, devido à falta de produção de melanina de *Candida parapsilosis* ATCC 22019, observaram-se valores mais baixos de percentagem de preto na presença e na ausência de l-DOPA, que foram inferiores a 60 de percentagem de preto, o que corresponde às cepas não melanizadas.

Em seguida, foi avaliada a sensibilidade dos IBPs e glifosato frente às cepas *Cryptococcus* spp., com o objetivo de avaliar a concentração inibitória mínima (MIC) utilizando concentrações abaixo da MIC na inibição da melanogênese. O controle para esta sensibilidade foi o fluconazol (FCZ), sendo que todas as cepas testadas foram sensíveis a anfotericina B (AMB), o que mostrou nove cepas de *Cryptococcus* spp. com MIC >2 µg/mL, levando-se em consideração que estas cepas são resistentes a AMB. Os IBPs mostraram um intervalo variável; o rabeprazol mostrou MIC mais baixo em 24 e 48 horas; e o omeprazol mostrou os menores MICs na leitura de 72 horas. Embora não tenha sido o objetivo deste estudo, drogas como omeprazol, rabeprazol e lansoprazol mostraram os MICs mais baixos.

O artigo de Küçükaslan et al. (2003) testaram o efeito antifúngico de omeprazol em cepas de *Candida* spp. mostrando resultados semelhantes a uma boa sensibilidade com MIC de 320 µg/mL. Não existem estudos em cepas de *Cryptococcus*. Além da sensibilidade antifúngica, estudos de Sterbini et al. (2016) mostram que os pacientes tratados com omeprazol têm diferenças na microbiota se comparados aos pacientes não tratados. Já os pacientes tratados com o uso de IBPs apresentam uma alteração na microbiota (KÜÇÜKASLAN et al., 2013; STERBINI et al., 2016). Gatta et al. (2002) estudaram 52 isolados de *Helicobacter pylori* frente a omeprazol e rabeprazol, com uma inibição de 50% de crescimento e concentrações de 32mg/L e 16mg/L, respectivamente (GATTA et al., 2003). Estes estudos apontam uma atividade na sensibilidade de microrganismos, são os possíveis mecanismos de ação não são explicados, abrindo, assim, a possibilidade de novos estudos nesta área.

Cepas previamente avaliadas na produção de melanina foram usadas nos testes de inibição da melanogênese. De forma qualitativa, o omeprazol apresentou uma

atividade inibidora interessante, em concentrações de 125 ug/ml, sem interferir no crescimento das cepas testadas de *Cryptococcus* spp.. Também ficou evidente, visualmente, o potencial inibitório da melanogênese por parte de omeprazol. A hipótese para esta atividade é que, provavelmente, esta droga iniba a lacase de forma reversível, já que, no sétimo dia, existe a presença de pontos pretos na condição D em que as cepas começaram a produzir melanina. Essa hipótese da inibição da lacase, como mecanismo de modulação negativa da melanogênese, é correlacionada aos estudos realizados em melanócitos (BAEK; LEE, 2015).

Com os resultados favoráveis à inibição da melanogênese no experimento qualitativo, avaliou-se quantitativamente: omeprazol, esomeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol e glifosato. O glifosato foi utilizado como controle positivo por ser uma droga previamente descrita como inibidora da melanogênese em cepas *Cryptococcus neoformans*. Assim, as soluções foram compatíveis com os estudos de Nosanchuk et al., (2001), em que o glifosato apresentou uma inibição da produção de melanina muito satisfatória, sendo considerada a melhor droga com os valores mais baixos de percentagem de preto.

Atualmente, não existem estudos avaliando o efeito dos IBPs na melanogênese fúngica. Os IBPs apontam uma atividade semelhante ao glifosato na inibição da melanogênese, cujo bloqueio de produção de melanina foi estatisticamente significativo com $p < 0,05$, quando comparada à condição A (1-DOPA) e à condição C (1-DOPA mais IBP). Esses resultados só confirmam a hipótese inicial deste trabalho em que os IBPs poderiam ter um efeito inibitório na produção de melanina, e que este efeito poderia estar associado a uma inibição de lacase, enzima responsável pela oxidação dos compostos fenólicos para a produção de melanina em cepas *Cryptococcus*. Outra hipótese possível seria que os IBPs inibem a capacidade da lacase de oxidar compostos fenólicos, mediante impedimento da ligação de cobre com esta enzima, uma vez que a lacase é uma enzima dependente de cobre. Esta hipótese é sustentada nos estudos de Matsui et al. (2015) (MATSUI et al., 2015). Os mecanismos explicados nesta pesquisa são hipotéticos e deixam um campo muito interessante para ser analisado e para se entender a ferramenta de ação dos IBPs na modulação negativa de melanina em cepas de *Cryptococcus neoformans/gattii lato sensu*.

Essa inibição da melanogênese tem, provavelmente, implicações na patogênese de *Cryptococcus*, logo, serão necessárias mais investigações para avaliar o potencial patogênico *in vivo* de cepas tratadas com IBPs. Melanina é um fator de virulência realmente relevante para *Cryptococcus* spp. e está relacionada à disseminação e tropismo pelo SNC. Cepas tratadas com IBP poderiam diminuir o potencial patogênico de *Cryptococcus*. Essas são perspectivas futuras que deixam um campo vasto de estudos sobre a patogênese *in vivo* e como esta pode ser afetada pela inibição da melanogênese.

Neste contexto, o presente estudo revelou que os IBPs têm um efeito sobre a inibição de crescimento em cepas de *Cryptococcus neoformans/gattii lato sensu*. Eles mostraram ainda que têm efeito na inibição da produção de melanina nas cepas testadas, que, provavelmente, poderiam modular a patogênese de *Cryptococcus* spp.. Porém, ainda são necessários estudos aprofundados para compreender o mecanismo de ação na sensibilidade e na inibição da melanina.

8 CONCLUSÃO

- A metodologia proposta para mensurar a produção de melanina em cepas de *Cryptococcus neoformans/gatti lato sensu* por meio da escala de cinza é efetiva, permitindo uma semiquantificação confiável;
- Os inibidores da bomba de prótons impedem o crescimento planctônico *in vitro* de cepas de *Cryptococcus neoformans/C. gattii lato sensu*;
- A produção de melanina é inibida em cepas de *Cryptococcus neoformans/gatti lato sensu* por meio de concentrações subinibitórias de omeprazol, pantoprazol, rabeprazol, esomeprazol e lansoprazol.

REFERÊNCIAS

ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. et al. Susceptibility test for fungi: clinical and laboratorial correlations in medical mycology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 57, n. Suppl 19, p. 57–64, 2015.

ALSPAUGH, J. A. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Fungal genetics and biology**, n. 919, p. 55–58, 2016.

BADIEE, P.; HASHEMIZADEH, Z. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 139, n. 2, p. 195–204, 14 fev. 2014.

BAEK, S.-H.; LEE, S.-H. Proton pump inhibitors decrease melanogenesis in melanocytes. **Biomedical reports**, v. 3, n. 5, p. 726–730, 2015.

BANERJEE., U. K. G. P. V. A case of prosthetic valve endocarditis caused by *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. **Journal of Medical & Veterinary Mycology**, v. 35, n. 8728, p. 139–141, 1997.

BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 14:1 medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. **Yeast**, v. 27, n. 11, p. 875–904, 2010.

BEARDSLEY, J. et al. Adjunctive dexamethasone in HIV-associated cryptococcal meningitis. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 6, p. 542–554, 2016.

BEJAR, V. et al. Molecular characterization and antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* strains collected from a single institution in Lima, Peru. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 32, n. 2, p. 88–92, 2015.

BENHAM, R. W. Cryptococci - their identification by morphology and by serology. **Journal of Infectious Diseases**, v. 57, p. 255–274, 1935.

BENHAM, R. W. Cryptococcosis and blastomycosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 50, n. 10, p. 1299–1314, 1950.

BICANIC, T. et al. Symptomatic relapse of HIV-associated cryptococcal meningitis after initial fluconazole monotherapy: the role of fluconazole resistance and immune reconstitution. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 43, n. 8, p. 1069–1073, 2006.

BOEKHOUT, T. et al. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 147, n. 4, p. 891–907, 2001.

BRAND, S. R. et al. Potent In Vitro Activity against *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. v. 60, n. 4, p. 2528–2531, 2016.

BRAUN, D. K. et al. Cryptococcal infection of a prosthetic dialysis fistula. **Am J Kidney Dis**, v. 24, n. 5, p. 864–867, 1994.

BRILHANTE, S. et al. An alternative method for the analysis of melanin production in *Cryptococcus neoformans sensu lato* and *Cryptococcus gattii sensu lato*. **Mycoses**, 2017.

BUCHANAN, K. L.; MURPHY, J. W. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, p. 71–83, 1998.

BUTLER, M. J.; DAY, A. W. Fungal melanins: a review. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 12, p. 1115–1136, 1998.

BUTTS, A. et al. Estrogen receptor antagonists are anti-cryptococcal agents that directly bind EF hand proteins and synergize with fluconazole in vivo. **mBio**, v. 5, n. 1, p. 1–11, 2014.

CALDERÓN, F.; IBAÑEZ, C.; HERNÁNDEZ, J. G. Meningitis criptocócica en paciente VIH positivo: Revisión a propósito de un caso clínico. **Revista Memoriza.com**, v. 5, p. 34–44, 2009.

CALSI, C. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Third Informational Supplement M27-S3. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2008.

CHANG, M. R. et al. Prostatic cryptococcosis: a case report. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 14, p. 378–385, 2008.

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

CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Isolation, characterization, and localization of a capsule-associated gene, CAP10, of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of**

Bacteriology, v. 181, n. 18, p. 5636–5643, 1999.

CHARLIER, C. et al. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 1, p. 120–127, 2009.

CHAYAKULKEEREE, M.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 20, n. 3, p. 507–544, 2006.

CHEN, L. C.; BLANK, E. S.; CASADEVALL, A. Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 3, n. 5, p. 570–574, 1996.

CHEN, S. C. A.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. *Cryptococcus gattii* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 980–1024, 2014.

CHOWDHARY, A. et al. Environmental prevalence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in India: An update. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 1–16, 1 fev. 2012.

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

CLSI. M27-S4: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, v. 32, n. 17, p. 28, 2012.

COSTERTON, J. W. et al. Microbial Biofilms. **Annual Reviews Microbiology**, v. 49, p. 711–745, 1995.

COX, G. M. et al. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 443–448, 2000.

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

CROSS, C. E.; BANCROFT, G. J. Ingestion of acapsular *Cryptococcus neoformans* occurs via mannose and ??- glucan receptors, resulting in cytokine production and increased phagocytosis of the encapsulated form. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 7,

p. 2604–2611, 1995.

CUNHA, M. M. L. et al. Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals. **BMC microbiology**, v. 10, p. 80, 2010.

DA SILVA, M. B. et al. Resistance of melanized yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis* to antimicrobial oxidants and inhibition of phagocytosis using carbohydrates and monoclonal antibody to CD18. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 644–648, 2009.

DALISAY DS, SALUDES JP, M. T. Ptilomycalin A inhibits laccase and melanization in *Cryptococcus neoformans*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 19, p. 6654–6657, 2011.

DEEPA. SRIKANTA, FELIPE H. SANTIAGO-TIRADO, AND T. L. D. *Cryptococcus neoformans*: Historical curiosity to modern pathogen. **Yeast (Chichester, England)**, v. 31, n. 2, p. 47–60, 2014.

DIXIT, A.; CARROLL, S. F.; QURESHI, S. T. *Cryptococcus gattii*: An emerging cause of fungal disease in North America. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2009, p. 840452, 2009.

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881–890, 2002.

EDWARDS, M. R. et al. Micromorphology of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Bacteriology**, v. 94, n. 3, p. 766–777, 1967.

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

EVANS, E. E. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans* I. A serologic classification by means of the capsular and agglutination reactions. **J. Immunol.**, v. 64, p. 423–430, 1950.

FERNANDES, B. et al. Fluorescent quantification of melanin. **International Federation Of Pigment Cell Societies · Society For Melanoma Research Pigment**, 2016.

FISHER, J. F.; VALENCIA-REY, P. A.; DAVIS, W. B. Pulmonary cryptococcosis in

the immunocompetent patient-Many questions, some answers. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 3, n. 3, p. 1–6, 2016.

GALANIS, E. et al. Clinical presentation, diagnosis and management of *Cryptococcus gattii* cases: Lessons learned from British Columbia. **The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology**, v. 20, n. 1, p. 23–8, 2009.

GARCÍA-RODAS, R. et al. *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement and cellular gigantism during *Galleria mellonella* infection. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, 2011.

GATTA, L. et al. Antimicrobial activity of esomeprazole versus omeprazole against *Helicobacter pylori*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 439–442, 2003.

GATTI, F; EECKELS, R. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894 Part I. Description of the disease and of the strain. **Annales de la Société Belges de Médecine Tropicale de Parasitologie, et de Mycologie**, v. 50, n. 6, p. 689–693, 1970.

GOMEREP, S. S. et al. Frequency of cryptococcal meningitis in HIV-1 infected patients in north central Nigeria. **Niger J Med**, v. 19, n. 4, p. 395–399, 2010.

GRANADOS, D. P.; CASTAÑEDA, E. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colombia, and study of ecological conditions in the area. **Microbial Ecology**, v. 49, n. 2, p. 282–290, 2005.

GRUPO DE CONSENSO DE CRIPTOCOCOSE. Consenso em criptococose - 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 524–544, 2008.

GUY, J. P. et al. *Cryptococcus* pneumonia presenting in an immunocompetent host with pulmonary asbestosis: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, v. 6, n. 1, p. 170, 2012.

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

HAGEN, F. et al. Molecular epidemiology and in vitro antifungal susceptibility testing of 108 clinical *Cryptococcus neoformans* sensu lato and *Cryptococcus gattii* sensu lato isolates from Denmark. **Mycoses**, v. 59, n. 9, p. 576–584, 2016.

HILARY, L. P. et al. Imaging Spectrum of Invasive Fungal and Fungal-like Infections 1. n. 1, 2017.

HUFFNAGLE, G. B. et al. Down-regulation of the afferent phase of t-cell-mediated pulmonary inflammation and immunity by a high melanin-producing strain of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Immunology**, v. 155, n. 7, p. 3507–3516, 1995.

JESSUP, C. J. et al. Fluconazole susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*: Comparison of two broth microdilution methods and clinical correlates among isolates from Ugandan AIDS patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 10, p. 2874–2876, 1998.

JONG, A. et al. Invasion of *C. neoformans* into human brain microvascular endothelial cells requires protein kinase C- α activation. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 9, p. 1854–1865, 2008.

JOSEPH HEITMAN, THOMAS R. KOZEL, KYUNG J. KWON-CHUNG, JOHN R. PERFECT, A. C. ***Cryptococcus: from human pathogen to model yeast***. [s.l: s.n.]. v. 11

KAPLAN, J. E.; MASUR, H.; HOLMES, K. K. Guidelines for preventing opportunistic infections among HIV-infected persons--2002. Recommendations of the U.S. Public Health Service and the Infectious Diseases Society of America. **MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports / Centers for Disease Control**, v. 51, n. RR-8, p. 1–52, 2002.

KECHICHIAN, T. B.; SHEA, J.; DEL POETA, M. Depletion of alveolar macrophages decreases the dissemination of a glucosylceramide-deficient mutant of *Cryptococcus neoformans* in immunodeficient mice. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 10, p. 4792–4798, 2007.

KIDD, S. E. et al. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 5, p. 1433–1443, 2007.

KIM, J. H. et al. Downregulation of melanin synthesis by haginin a and its application

to in vivo lightening model. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 5, p. 1227–1235, 2008.

KNOLLMAN, B.; CHABNER, B.; BRUNTON, L. **Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics** New York: McGraw-Hill Medical, , 2011.

KOZEL, T. R. et al. Downregulation by cryptococcal polysaccharide of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta secretion from human monocytes . Downregulation by cryptococcal polysaccharide of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 \square secretion from human mono. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 8, p. 2919–2923, 1995.

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

KÜÇÜKASLAN, F. et al. Assessment of antifungal effect of omeprazole on *Candida albicans*. **International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research**, v. 4, n. 3, p. 45–51, 2013.

LINDSLEY, M. D. et al. Evaluation of a newly developed lateral flow immunoassay for the diagnosis of cryptococcosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 4, p. 321–325, 2011.

LIU, X. Z. et al. Towards an integrated phylogenetic classification of the *Tremellomycetes*. **Studies in Mycology**, v. 81, p. 85–147, 2015.

LODDER, J.; KREGER-VAN RIJ, N. J. W. **The yeasts : a taxonomic study**. 1. ed. [s.l: s.n.].

LORTHOLARY, O. et al. Incidence and risk factors of immune reconstitution inflammatory syndrome complicating HIV-associated cryptococcosis in France. **AIDS (London, England)**, v. 19, n. 10, p. 1043–1049, 2005.

LOZANO-CHIU, M. et al. Detection of resistance to amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* clinical isolates: Performances of three different media assessed by using E- test and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A methodologies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 10, p. 2817–2822, 1998.

MA, H.; MAY, R. C. Chapter 5 Virulence in *Cryptococcus* species. **Advances in Applied Microbiology**, v. 67, n. C, p. 131–190, 2009.

MACDOUGALL, L. et al. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific Northwest, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 42–50, 2007.

MAFRA, M. D. O. et al. Criptococose disseminada em lúpus eritematoso sistêmico. **Sociedade Brasileira de Reumatologia**, v. 48, n. 6, p. 373–378, 2008.

MARTINEZ, L. R. et al. Voriconazole inhibits melanization in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 12, p. 4396–4400, 2007.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro susceptibility of *cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 3, p. 1021–1033, 2006.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Biofilm formation by *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology spectrum**, v. 3, n. 3, p. 1–11, 2015.

MATSUI, M. S. et al. Omeprazole, a gastric proton pump inhibitor, inhibits melanogenesis by blocking ATP7A trafficking. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 10, p. 834–841, 2015.

MAY, R. C. et al. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. Box 3, p. 106–117, 2015.

MCFADDEN, D. C.; DE JESUS, M.; CASADEVALL, A. The physical properties of the capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* suggest features for capsule construction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 4, p. 1868–1875, 2006.

MEYER, W. et al. 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 epidemiol. **Electrophoresis**, v. 20, p. 1790–1799, 1999.

MEYER, W. et al. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans*

isolates. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p. 189–195, 2003.

MEYER, W. et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Medical Mycology**, v. 47, n. 6, p. 561–570, 2009.

MICHAEL H. WHEELER, A. A. B. **Current Topics in Medical Mycology**. 1. ed. [s.l.] Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg London Paris Tokyo, 1988. v. 2

MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 515–48, 1995.

MYLONAKIS, E. et al. Nonlinear partial differential equations and applications: Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 24, p. 15675–15680, 2002.

NICOLA, A. M.; ROBERTSON, E. J. Nonlytic exocytosis of *Cryptococcus neoformans* from macrophages. **mBio**, v. 2, n. 4, p. 1–9, 2011.

NISHIKAWA, H. et al. In vitro and in vivo antifungal activities of T-2307, a novel arylamidine, against *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 6, p. 1709–1713, 1 jun. 2017.

NISHIKAWA, M. M. et al. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: Analysis of host and regional patterns. v. 41, n. 1, p. 73–77, 2003.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Budding of melanized *Cryptococcus neoformans* in the presence or absence of L-DOPA. **Microbiology**, v. 149, n. 7, p. 1945–1951, 2003.

NOSANCHUK, J. D.; OVALLE, R.; CASADEVALL, A. Glyphosate inhibits melanization of *Cryptococcus neoformans* and prolongs survival of mice after systemic infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 7, p. 1093–1099, 2001.

NOSANCHUK, J. D.; STARK, R. E.; CASADEVALL, A. Fungal melanin: What do we know about structure? **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. DEC, p. 1–7, 2015.

NOVERR, M. C. et al. CNLAC1 Is required for extrapulmonary dissemination of *Cryptococcus neoformans* but not pulmonary persistence. **Society**, v. 72, n. 3, p. 1693–1699, 2004.

NYAZIKA, T. K. et al. *Cryptococcus tetragattii* as a major cause of cryptococcal meningitis among HIV-infected individuals in Harare, Zimbabwe. **Journal of Infection**, v. 72, n. 6, p. 745–752, 2016.

OH, K. S.; HWANG, S. M. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* from environmental sources in Busan. **Mycobiology**, v. 33, n. 4, p. 188–93, 2005.

OLIVEIRA, M.; SEVERO. Diagnóstico laboratorial das micoses pulmonares. **Jornal Brasileiro Pneumologia**, v. 35, n. 9, p. 907–919, 2009.

OLSZEWSKI, M. A. et al. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. **The American Journal of Pathology**, v. 164, n. 5, p. 1761–1771, 2004.

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

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

PERDIGÃO-NETO, L. Aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais da criptococose. 2011.

PÉREZ, C. et al. Identificación de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* mediante el uso del medio canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB). **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología** scielo_ven , , 2003.

POLACHEK, I. The discovery of melanin production in *Cryptococcus neoformans* and its impact on diagnosis and the study of virulence. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 276, n. 1, p. 120–123, 1991.

PRADO, M. et al. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: A review from 1996 to 2006. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513–521, 2009.

RAJASINGHAM, R. et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: An updated analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3099, n. 17, p. 1–9, 2017.

RAMAGE, G. et al. Fungal biofilm resistance. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 2012.

RANI, M. H. S. et al. Isolation and serological analyses of fungal melanins. **Infection and Immunity**, v. 6, n. 4, p. 1–7, 2012.

RETINI, C. et al. Encapsulation of *Cryptococcus neoformans* with glucuronoxylomannan inhibits the antigen-presenting capacity of monocytes. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 2, p. 664–669, 1998.

ROBERT, V.; CARDINALI, G.; CASADEVALL, A. Distribution and impact of yeast thermal tolerance permissive for mammalian infection. **BMC Biology**, v. 13, n. 1, p. 18, 2015.

ROSAS, A. L. et al. Isolation and serological analyses of fungal melanins. **Journal of Immunological Methods**, v. 244, n. 1–2, p. 69–80, 2000.

SABIITI, W. et al. Efficient phagocytosis and laccase activity affect the outcome of HIV-associated cryptococcosis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 5, p. 2000–2008, 2014.

SALAS, S. D. et al. Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. August, p. 377–386, 1996.

SÁNCHEZ-FERRER, Á. et al. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular**, v. 1247, n. 1, p. 1–11, 1995.

SANTANGELO, R. et al. Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model. **American Society for Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2229–2239, 2004.

SÉGOLÈNE, N. et al. Primary cutaneous cryptococcosis: a distinct clinical entity. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 3, p. 337–347, 2003.

SINGHAL, A.; CHOUDHARY, G.; THAKUR, I. S. Characterization of laccase activity produced by *Cryptococcus albidus*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 42, n. 2, p. 113–124, 2012.

SOUTO, A. C. P. et al. Population genetic analysis reveals a high genetic diversity in the Brazilian *Cryptococcus gattii* VGII population and shifts the global origin from the Amazon rainforest to the semi-arid desert in the northeast of Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 8, p. 1–19, 2016.

SPANAKIS, E. K.; APERIS, G.; MYLONAKIS, E. New agents for the treatment of fungal infections: clinical efficacy and gaps in coverage. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 8, p. 1060–8, 2006.

SPINA-TENSINI, T. et al. Geographic distribution of patients affected by *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complexes meningitis, pigeon and tree populations in Southern Brazil. **Mycoses**, v. 60, n. 1, p. 51–58, 2017.

SPRINGER, D. J. et al. *Cryptococcus gattii* VGIII isolates causing infections in HIV/AIDS patients in Southern California: identification of the local environmental source as arboreal. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 8, 2014.

STAIB, F. *Cryptococcus neoformans* and *Guizotia abyssinica*. **Zeitschrift f. Hygiene**, v. 475, p. 466–475, 1962.

STEENBERGEN, J. N.; CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 7, p. 667–675, 2003.

STERBINI, F. P. et al. Effects of proton pump inhibitors on the gastric mucosa-associated microbiota in dyspeptic patients. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 22, p. 6633–6644, 2016.

TAYLOR-SMITH, L. M.; MAY, R. C. New weapons in the *Cryptococcus* infection toolkit. **Current Opinion in Microbiology** Elsevier Ltd, , 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2016.07.018>>

TIEF, K. et al. Tyrosinase, the key enzyme in melanin synthesis, is expressed in murine brain. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 241, n. 1, p. 12–16, 1996.

TREVINO-RANGELL, R. D. J. et al. Activity of sertraline against *Cryptococcus*

neoformans: In vitro and in vivo assays. **Medical Mycology**, v. 54, n. 3, p. 280–286, 2016.

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

VELEGRAKI, A. et al. Prospective use of RFLP analysis on amplified *Cryptococcus neoformans* URA5 gene sequences for rapid identification of varieties and serotypes in clinical samples. **Medical Mycology**, v. 39, n. 2000, p. 409–417, 2001.

VU, K. et al. Invasion of the central nervous system by *Cryptococcus neoformans* requires a secreted fungal metalloprotease. **mBio**, v. 5, n. 3, p. 1–13, 2014.

WALSH, T. J. et al. Ventriculoatrial shunt infection due to *Cryptococcus neoformans*: an ultrastructural and quantitative microbiological study. **Neurosurgery**, v. 18, n. 3, p. 376–382, 1 mar. 1986.

WANG, L.; ZHAI, B.; LIN, X. The link between morphotype transition and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 6, 2012.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: Mechanism of action. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 8, p. 3131–3136, 1995.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 7, p. 3004–3007, 1994.

WILLIAMSON, P. R. et al. Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. **Nature Publishing Group**, 2016.

WILSON, D. E.; BENNETT, J. E.; BAILEY, W. Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. **P.S.E.B.M.**, v. 127, n. 5, p. 820–823, 1968.

WOOD, L.; MIEDZINSKI, L. Skeletal cryptococcosis: Case report and review of the literature. **The Canadian journal of infectious diseases**, v. 7, n. 2, p. 125–32, 1996.

ZARAGOZA, O. et al. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*.

Advances in Applied Microbiology, v. 2164, n. 9, p. 1–64, 2010.

ANEXO A

Received: 23 February 2017 | Revised: 25 May 2017 | Accepted: 25 May 2017

DOI: 10.1111/myc.12650

ORIGINAL ARTICLE

WILEY  mycoses

An alternative method for the analysis of melanin production in *Cryptococcus neoformans sensu lato* and *Cryptococcus gattii sensu lato*

8 Raimunda S. N. Brillhante¹  | Jaime D. A. España¹ | Lucas P. de Alencar¹ |
13 Vandbergue S. Pereira¹ | Débora de S. C. M. Castelo-Branco¹ |
14 Waldemiro de A. Pereira-Neto¹ | Rossana de A. Cordeiro¹ | José J. C. Sidrim¹ |
16 **1** Marcos F. G. Rocha^{1,2}

¹Department of Pathology and Legal Medicine, School of Medicine, Specialized Medical Mycology Center, Postgraduate Program in Medical Microbiology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

²School of Veterinary Medicine, Postgraduate Program in Veterinary Sciences, State University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

2 Correspondence

Raimunda S. N. Brillhante, Department of Pathology and Legal Medicine, School of Medicine, Specialized Medical Mycology Center, Postgraduate Program in Medical Microbiology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil.
 Email: brillhante@ufc.br

Funding information

National Council for Scientific and Technological Development, Grant/Award Number: 445670/2014-2; Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES)

3 Summary

Melanin is an important virulence factor for several microorganisms, including *Cryptococcus neoformans sensu lato* and *Cryptococcus gattii sensu lato*, thus, the assessment of melanin production and its quantification may contribute to the understanding of microbial pathogenesis. The objective of this study was to standardise an alternative method for the production and indirect quantification of melanin in *C. neoformans sensu lato* and *C. gattii sensu lato*. Eight *C. neoformans sensu lato* and three *C. gattii sensu lato*, identified through URAS methodology, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (negative control) and one *Hortaea werneckii* (positive control) were inoculated on minimal medium agar with or without L-DOPA, in duplicate, and incubated at 35°C, for 7 days. Pictures were taken from the third to the seventh day, under standardised conditions in a photographic chamber. Then, photographs were analysed using grayscale images. All *Cryptococcus* spp. strains produced melanin after growth on minimal medium agar containing L-DOPA. *C. parapsilosis* ATCC 22019 did not produce melanin on medium containing L-DOPA, while *H. werneckii* presented the strongest pigmentation. This new method allows the indirect analysis of melanin production through pixel quantification in grayscale images, enabling the study of substances that can modulate melanin production.

KEYWORDS

Cryptococcus, grayscale images, melanin, pigmentation measurement, yeast



Journal Name	MYC
Manuscript No.	12650
WILEY	
No. of pages: 6	Dispatch: 17-6-2017
PE: Eswari M	CE Madhumitha R

ANEXO B

Ágar meio mínimo adaptado para análise da produção de melanina em *Cryptococcus* spp.

Inicialmente, é preparado meio mínimo líquido, duas vezes concentrado (2X), para preparar 100 ml, sendo necessário:

Glicose: 0.54 gramos

MgSO₄: 0.48 gramos

K₂HPO₄: 1.02 gr

Glicina: 0.194 gramos

Tiamina 0.2 gramos

l-DOPA: 10 mM

Água destilada 100 ml.

Este meio mínimo líquido (2X concentrado) só pode ser filtrado com membrana de 0.22 µm, já que não pode ser autoclavado por conter tiamina e l-DOPA, que são termolábeis. Também é necessário ágar bacteriológico, sem aminoácidos e glicose, numa concentração de três gramas em 100 ml de água destilada; este meio pode ser autoclavado.

Para a montagem na placa de 24 poços, é recomendado manter o meio mínimo líquido a uma temperatura de 40 °C. Este aquecimento é importante porque, na hora de misturar o ágar bacteriológico, se o meio mínimo líquido está muito frio, a mistura de meio mínimo com ágar bacteriológico solidifica muito rapidamente. Para formar ágar meio mínimo, mistura-se meio mínimo líquido e ágar bacteriológico a uma taxa de 3% em partes iguais (1/1).