

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**UNIFAL - MG**

**CRISTIANE BIGATTI PEREIRA**

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MELANINA EM *Cryptococcus neoformans* SOB  
DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO E POR MEIO DA ELETROFORESE  
NÃO-DESNATURANTE: INFLUÊNCIA *IN VITRO* NA ATIVIDADE DE  
ANTIFÚNGICOS**

**ALFENAS, MG**

**2008**

**CRISTIANE BIGATTI PEREIRA**

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MELANINA EM *Cryptococcus neoformans* SOB  
DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO E POR MEIO DA ELETROFORESE  
NÃO-DESNATURANTE: INFLUÊNCIA *IN VITRO* NA ATIVIDADE DE  
ANTIFÚNGICOS**

**Dissertação apresentada ao Programa de  
Mestrado em Ciências Farmacêuticas da  
UNIFAL–MG como parte dos requisitos para  
obtenção do título de mestre.**

**Orientador: Prof. Dr. Antonio Martins de  
Siqueira.**

**Co-Orientadora: Profa. Dra. Amanda Latercia  
Tranches Dias.**

**ALFENAS, MG  
2008**

## UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL/MG

## PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO

A comissão examinadora, abaixo-assinada, aprova a dissertação "AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MELANINA EM *Cryptococcus neoformans* SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO E POR MEIO DA ELETROFORESE NÃO-DESNATURANTE: INFLUÊNCIA *IN VITRO* NA ATIVIDADE DE ANTIFÚNGICOS", elaborada por Cristiane Bigatti Pereira, como requisito parcial para conclusão do Curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Antonio Martins de Siqueira - Orientador UNIFAL/MG

---

Prof. Dr. Eriques Gonçalves da Silva

---

Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco

Alfenas, 27 de agosto de 2008.

*Dedico este trabalho a Deus que muito me ajudou e sustentou;*

*Aos meus Amados pais Raulino e Lúcia,*

*ao meu irmão Marlúcio e esposa Simone*

*pela confiança e apoio que foram fundamentais*

*na realização deste curso e concretização deste sonho.*

*Amo vocês!*

*Essa vitória e conquista é nossa!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a ti Senhor por que: “tu és o meu Deus; exaltar-te-ei a ti, e louvarei o teu nome porque fizestes maravilhas; os teus conselhos antigos são verdade e firmeza” (Isaías 25:1) e “Porque desde a antiguidade não se ouviu, nem com ouvido se percebeu, nem com os olhos se viu um Deus além de ti, que trabalha para aquele que nele espera.” (Isaías 64:4).

Muito obrigada, Senhor, pelo amor incondicional, cuidado e misericórdias que sempre se renovam sobre mim e me fizeram alcançar mais esta bênção!

Ao Querido amigo e Orientador Tonhão que corajosamente aceitou o desafio desta orientação em meio a tantas responsabilidades e compromissos, essa conquista não seria possível sem sua preciosa e importante participação, obrigada por tudo! Você é um exemplo de honestidade e trabalho que todos deveriam conhecer!

À Querida amiga e co-Orientadora Amanda, que é a prova de que Deus coloca anjos em nosso caminho para ajudar a vencer todas as provas e obstáculos. Obrigada pela imensa paciência, atenção e carinho que foram indispensáveis para que conseguisse essa vitória que também é sua!

À Querida amiga Maurette que sem dúvida alguma foi mais um anjo colocado por Deus em meu caminho para me ensinar que não há limite para alcançar um objetivo, sua amizade é um bem precioso que levarei pra sempre em meu coração!

Aos amigos Priscilla, Eduardo e André que tornaram divertidos o período de aulas, estágio docente e ajudaram na soma de conhecimentos.

Ao querido amigo Frank Lucarini que muito me ajudou na execução deste trabalho, você também é responsável por esta conquista, muito obrigada pelo carinho, disposição e dedicação neste trabalho.

Aos Queridos irmãos em Cristo que muito oraram por mim, em especial aos irmãos da Igreja Cristã Maranata de Alfenas que foram acolhedores e importantes na fase de adaptação à Alfenas.

À Giselle, Lu e colegas do Easy English school pelo apoio, conhecimento, momentos de descontração e principalmente obrigada pelo carinho!

Aos professores do Mestrado em Ciências Farmacêuticas da UNIFAL-MG, obrigada por todo conhecimento transmitido, pela amizade e carinho.

Aos colegas e funcionários dos Laboratórios de Microbiologia e Imunologia Básicas e de Biologia Molecular que me receberam carinhosamente e pacientemente me ajudaram a execução do trabalho.

E aos amigos Cecília e Ronan da Biblioteca que gentilmente ajudaram na conferência deste documento meu muito obrigada!

## RESUMO

A criptococose é infecção fúngica oportunista causada pelo *Cryptococcus neoformans* com alta incidência em indivíduos imunodebilitados, principalmente entre pacientes com Aids, sendo o número de casos registrados da doença no Brasil, 474.279, de 1980 a junho de 2007. Para melhor compreensão do agente etiológico, da criptococose e dos fatores associados à virulência são necessários estudos adicionais sobre a patogênese deste microrganismo. Dentre os fatores relacionados à virulência, a melanina é um dos principais e sua síntese ocorre por ação da lacase. Assim sendo, foram realizados estudos para avaliar a produção do pigmento entre amostras clínicas e ambientais de *C. neoformans* sob diferentes condições de pH (5, 6 e 7) e temperatura (25 °C, 30 °C e 35°C). A relação do pigmento com o perfil de sensibilidade aos antifúngicos fluconazol e anfotericina B também foi avaliada. Os resultados mostraram que não houve comportamento uniforme de melanização entre as amostras. As maiores alterações de pigmentação e crescimento das leveduras foram observadas nos meios de cultura com pH 7 incubados a 35 °C. A técnica de eletroforese em gel PAGE não-desnaturante mostrou-se uma ferramenta útil na análise da lacase produzida pelas amostras de *C. neoformans* com posterior quantificação de melanina por densitometria das bandas após reação com o substrato L-dopa. As amostras ambientais apresentaram os maiores valores de intensidade de melanina e ampla faixa de variação. Mais da metade das amostras clínicas (56,2 %) apresentaram as menores intensidades de melanina. A amostra clínica ICB 88 revelou duas bandas de melanina no gel indicando a presença de duas isoformas da lacase. Os testes de sensibilidade aos antifúngicos fluconazol e anfotericina B, através das metodologias de difusão em agar por disco e fita (E-test<sup>®</sup>), mostraram que a leitura após 72 h de incubação pode levar a erro na classificação quanto ao perfil de sensibilidade, tanto nos testes com ou sem adição de melanina. Adição de melanina pareceu não interferir nos resultados frente ao fluconazol nas metodologias de difusão em agar a partir de disco e fita (E-test<sup>®</sup>). Para anfotericina B houve aumento de CIMs para 90,9 % das amostras, sendo 45,4 % superior a 2 diluições com adição de melanina nos testes de sensibilidade na metodologia de difusão em agar a partir de fita (E-test<sup>®</sup>).

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*, melanina, lacase, antifúngicos, eletroforese.

## ABSTRACT

Cryptococcosis is an opportunistic fungal infection caused by *Cryptococcus neoformans* that has presented increased incidence with the great number of immunocompromised patients, mainly AIDS ones, being 474.273, the number of cases registered in Brazil since 1980 to June 2007. Additional studies about microorganism's pathogenesis is necessary for better comprehension about the aetiological agent, cryptococcosis and associated factors to virulence. Among virulence's factors, melanin is one of the mainly and its synthesis occurs by laccases action. So, some studies were performed to evaluate the melanin pigment's production between clinical and environmental strains of *C. neoformans* under different conditions of pH (5, 6 and 7) and temperatures (25 °C, 30 °C and 35 °C). The pigment and susceptibility to fluconazole and amphotericin B relation's was also evaluated. The results showed that there wasn't comparable behaviour of melanization among the strains. The higher alterations on yeast's pigmentation and growth were noted under pH 7 and at 35 °C. The electrophoresis technique on non-denaturant PAGE gel showed to be an useful tool to the analysis of laccase produced by *C. neoformans* strains and posterior quantification of melanin by spot's densitometry after reaction with L-dopa substrate. The environmental strains showed the higher values of melanin intensities and large variation range. Over than a half of clinical strains (56.2 %) showed the lower melanin's intensities. The clinical strain, ICB 88 revealed two melanin spots on gel indicating the presence of two laccase isoforms. The susceptibility antifungal tests with fluconazole and amphotericin B through disk diffusion and E-test<sup>®</sup> methods showed that reading after 72 hours can induce to mistakes on the susceptibility profile of strains, either in presence or absence of melanin. Addition of melanin on medium surface appears not change the results of susceptibility to fluconazole in disk diffusion and E-test<sup>®</sup>, but to amphotericin B was observed increase of MICs to 90.9 % of strains, been 45.4 % upper to 2 dilutions after addition of melanin in E-test<sup>®</sup> methodology.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*, melanin, laccase, antifungals, electrophoresis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 5.1	Curva de Calibração do Reagente de Bradford .....	44
Figura 6.1	Melanização das amostras clínicas de <i>C. neoformans</i> : VP Bet (a), ICB 189 (b), ICB 95 (c) e ICB 88 (d) após 8 dias em meio com pH 5,0 e incubação a 25°C .....	60
Figura 6.2	Melanização das amostras clínicas de <i>C. neoformans</i> : VP Bet (a), ICB 189 (b), ICB 95 (c) e ICB 88 (d) após 8 dias em meio com pH 5,0 e incubação a 30°C .....	60
Figura 6.3	Melanização das amostras clínicas de <i>C. neoformans</i> : VP Bet (a), ICB 189 (b), ICB 95 (c) e ICB 88 (d) após 8 dias em meio com pH 5,0 e incubação a 35°C .....	60
Figura 6.4	Melanização das amostras clínicas de <i>C. neoformans</i> : VP Bet (a), ICB 189 (b), ICB 95 (c) e ICB 88 (d) após 8 dias em meio com pH 6,0 e incubação a 25°C .....	61
Figura 6.5	Melanização das amostras clínicas de <i>C. neoformans</i> : VP Bet (a), ICB 189 (b), ICB 95 (c) e ICB 88 (d) após 8 dias em meio com pH 6,0 e incubação a 30°C .....	61
Figura 6.6	Melanização das amostras clínicas de <i>C. neoformans</i> : VP Bet (a), ICB 189 (b), ICB 95 (c) e ICB 88 (d) após 8 dias em meio com pH 6,0 e incubação a 35°C .....	61
Figura 6.7	Melanização das amostras clínicas de <i>C. neoformans</i> : VP Bet (a), ICB 189 (b), ICB 95 (c) e ICB 88 (d) após 8 dias em meio com pH 7,0 e incubação a 25°C .....	61
Figura 6.8	Melanização das amostras clínicas de <i>C. neoformans</i> : VP Bet (a), ICB 189 (b), ICB 95 (c) e ICB 88 (d) após 8 dias em meio com pH 7,0 e incubação a 30°C .....	61
Figura 6.9	Melanização das amostras clínicas de <i>C. neoformans</i> : VP Bet (a), ICB 189 (b), ICB 95 (c) e ICB 88 (d) após 8 dias em meio com pH 7,0 e incubação a 35°C .....	61
Figura 6.10	Gel 1 - amostras clínicas de <i>C. neoformans</i> : ICB 81 (2), ICB 154 (3), VP Bet (4), ICB 95 (5), HNR 41 (6) e branco (1) .....	65
Figura 6.11	Gel 2 - amostras clínicas de <i>C. neoformans</i> : RO1 (2), HNR 39 (3), ICB 155 (4), CN 103 (5), ICB 23 (6) e branco (1) .....	65
Figura 6.12	Gel 3 - amostras clínicas de <i>C. neoformans</i> : ICB 169 (2), ICB 89 RN (3), ICB 189 (4), ICB 88 (5 e 6), RO2 (7) e branco (1) ....	65

Figura 6.13	Gel 4 - amostras ambientais de <i>C. neoformans</i> : Sul amb 3 (2), B 60 (3), Sul amb 1 (4), ICB 184 (5), B 52 (6) e branco (1) .....	65
Figura 6.14	Gel 5 - amostras ambientais de <i>C. neoformans</i> : B 51 (2), B 79 (3), BO 5 (4), BO 2 (5), ICB 187 (6) e branco (1) .....	66
Figura 6.15	Gel 6 - amostras ambientais de <i>C. neoformans</i> : ICB 178 (2), C 7 (3), C 18 (4), B 78 (5), B 96 (6) e branco (1) .....	66
Figura 6.16	Gel com padrão ATCC 90112 de <i>C. neoformans</i> (2), branco (1) .....	66
Figura 6.17	Gel com padrão da Lacase de <i>Rhus vernificera</i> Sigma® na concentração de 2,8 µg/µL. As setas indicam a separação da enzima em três bandas visíveis no gel, confirmando a obtenção de melanina .....	66
Gráfico 6.1	Intensidades de melanina das amostras clínicas de <i>C. neoformans</i> após densitometria das bandas obtidas por eletroforese não-desnaturante e reveladas em tampão L-dopa .....	68
Gráfico 6.2	Intensidades de melanina das amostras ambientais e do padrão ATCC 90112 de <i>C. neoformans</i> após densitometria das bandas obtidas por eletroforese não-desnaturante e reveladas em tampão L-dopa .....	68
Quadro 6.1	Distribuição das proporções de melanina das amostras de <i>C. neoformans</i> (clínicas, ambientais e o padrão ATCC 90112) em intervalos e porcentagens .....	69
Figura 6.18	Partículas de melanina das amostras clínicas ICB 95 (A), ICB 189 (B) e ambiental ICB 178 (C) de <i>C. neoformans</i> . Aumento de 100X. As fotos são exemplos de algumas das partículas de melanina obtidas e mostram os diferentes tamanhos e intensidades de pigmentação .....	70
Figura 6.19	Placas do teste de sensibilidade da amostra ICB 88 com discos de anfotericina B (à esquerda) e fluconazol (à direita) da placa sem adição (A) e com adição (B) de partículas de melanina .....	71
Figura 6.20	Placas do teste de sensibilidade da amostra BO 2 com discos de anfotericina B (à esquerda) e fluconazol (à direita) da placa sem adição (A) e com adição (B) de partículas de melanina .....	71
Figura 6.21	Placas do teste de sensibilidade da amostra ICB 189 com discos de anfotericina B (à esquerda) e fluconazol (à direita) da placa sem adição (A) e com adição (B) de partículas de melanina .....	71
Figura 6.22	Placas do teste de sensibilidade da amostra B 96 com discos de Anfotericina B (à esquerda) e Fluconazol (à direita) da placa na ausência (A) e presença (B) de partículas de melanina .....	71

Quadro 6.2	Avaliação percentual do perfil de sensibilidade antifúngica de amostras clínicas (Cl), ambientais (Am) e do padrão ATCC 90112 (Pd) de <i>C. neoformans</i> conforme resultados da difusão em agar a partir de disco (Documento M44 A, CLSI, 2004) com e sem adição de melanina a 48 h e 72 h .....	74
Figura 6.23	Placas do teste de sensibilidade da amostra ICB 189 de <i>C. neoformans</i> por difusão em agar a partir de fita (E-test®) de anfotericina B (à esquerda) e fluconazol (à direita) da placa sem adição (A) e com adição (B) de partículas de melanina .....	75
Figura 6.24	Placas do teste de sensibilidade da amostra B 96 de <i>C. neoformans</i> por difusão em agar a partir de fita (E-test®) de anfotericina B (à esquerda) e fluconazol (à direita) da placa sem adição (A) e com adição (B) de partículas de melanina .....	75
Figura 6.25	Placas do teste de sensibilidade da amostra ICB 88 de <i>C. neoformans</i> por difusão em agar a partir de fita (E-test®) de anfotericina B (à esquerda) e fluconazol (à direita) da placa sem adição (A) e com adição (B) de partículas de melanina .....	75
Figura 6.26	Placas do teste de sensibilidade da amostra BO 2 de <i>C. neoformans</i> por difusão em agar a partir de fita (E-test®) de anfotericina B (à esquerda) e fluconazol (à direita) sem adição (A) e com adição (B) de partículas de melanina .....	75
Quadro 6.3	Avaliação percentual do perfil de sensibilidade antifúngica de amostras clínicas, ambientais e do padrão ATCC 90112 de <i>C. neoformans</i> através da metodologia de difusão em agar a partir de fita (E-test®) para o fluconazol e anfotericina B com e sem adição de melanina após 48 e 72 h .....	78
Quadro 6.4	Distribuição das diferenças de CIMs das amostras clínicas, ambientais e ATCC 90112 de <i>C. neoformans</i> conforme resultados da difusão em agar a partir de fita (E-test®) com e sem adição de melanina após 48 e 72h de incubação .....	79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1	Volumes de tampão de amostra, extrato celular e total aplicado no gel para as amostras de <i>C. neoformans</i> (clínicas, ambientais e ATCC 90112)..	46
Tabela 6.1	Resultados da melanização de amostras ambientais, clínicas e do padrão ATCC 90112 de <i>C. neoformans</i> crescidas em meio sólido sob diferentes temperaturas (25 °C, 30 °C e 35 °C) e pH (5,0; 6,0 e 7,0) após 8 dias de incubação .....	62
Tabela 6.2	Intensidades das bandas com e sem melanina nos géis e as proporções de melanina das amostras clínicas, ambientais e o padrão ATCC 90112 de <i>C. neoformans</i> .....	67
Tabela 6.3	Avaliação da sensibilidade aos antifúngicos fluconazol (FLU) e anfotericina B (AB) através da metodologia de difusão em agar a partir de disco (Documento M44 A, CLSI, 2004) com e sem adição de melanina das amostras e dos padrões: <i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 90112, <i>Candida krusei</i> ATCC 6258 e <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019 .....	72
Tabela 6.4	Perfil de sensibilidade antifúngica de amostras clínicas, ambientais e o padrão ATCC 90112 de <i>C. neoformans</i> através da difusão em agar a partir de disco com fluconazol com e sem adição de melanina após 48 h e 72 h de incubação .....	73
Tabela 6.5	Perfil de sensibilidade antifúngica de amostras clínicas, ambientais e o padrão ATCC 90112 de <i>C. neoformans</i> através da difusão em agar a partir de disco com anfotericina B com e sem adição de melanina após 48 h e 72 h de incubação .....	73
Tabela 6.6	Avaliação da sensibilidade aos antifúngicos fluconazol (FLU) e anfotericina B (AB) através da metodologia de difusão em agar a partir de fita (E-test®) com e sem adição de melanina das amostras e dos padrões: <i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 90112, <i>Candida krusei</i> ATCC 6258 e <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019 .....	76
Tabela 6.7	Perfil de sensibilidade antifúngica de amostras clínicas, ambientais e do padrão ATCC 90112 de <i>C. neoformans</i> através da metodologia de difusão em agar a partir de fita (E-test®) para o fluconazol com e sem adição de melanina após 48 h e 72 h de incubação .....	77
Tabela 6.8	Perfil de sensibilidade antifúngica de amostras clínicas, ambientais e o padrão ATCC 90112 de <i>C. neoformans</i> através da metodologia de difusão em agar a partir de fita (E-test®) para anfotericina B com e sem adição de melanina após 48 h e 72 h de incubação .....	78
Tabela 6.9	Valores de CIM através da metodologia de difusão em agar a partir de fita (E-test®) para o fluconazol e anfotericina B com e sem adição de melanina após 48 h e 72 h de incubação das amostras clínicas, ambientais e ATCC 90112 de <i>C. neoformans</i> .....	79

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AB	Anfotericina B
Abs.	Absorvância
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida ( <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> )
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Col.	Colaboradores
Dest.	Destilada
Doc.	Documento
Fz	Fluconazol
I	Intermediário
Mel.	Melanina
PAGE	<i>Polyacrylamide gel Electrophoresis</i>
R	Resistente
S	Sensível
S-DD	Sensível Dose-Dependente
S-DD/R	Sensível Dose-Dependente/ Resistente
Vol.	Volume

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>27</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
5.1	AMOSTRAS DE <i>Cryptococcus neoformans</i> , TESTES E CONTROLES .....	40
5.2	PRODUÇÃO DE MELANINA EM MEIO SÓLIDO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	41
5.2.1	Meio com L-dopa .....	41
5.2.2	Preparo dos inóculos .....	41
5.2.3	Procedimentos .....	41
5.3	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MELANINA POR MEIO DA ELETROFORESE EM GEL PAGE NÃO-DESNATURANTE .....	42
5.3.1	Amostras, meios de cultura e inóculos .....	42
5.3.2	Montagem do gel de poliacrilamida não-desnaturante .....	42
5.3.3	Etapas de pré-extração das células .....	43
5.3.4	Extração das amostras de <i>C. neoformans</i> com ultra-som .....	43
5.3.5	Quantificação da proteína total .....	44
5.3.5.1	Cálculo da proteína total e padronização da quantidade aplicada no gel .....	45
5.3.6	Preparo das amostras e do padrão de lacase para aplicação no gel .....	46
5.3.7	Eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante .....	47
5.3.8	Quantificação do pigmento .....	47
5.4	SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS .....	48
5.4.1	Obtenção das partículas de melanina .....	49
5.4.1.1	Preparo do inóculo .....	49
5.4.1.2	Procedimentos para melanização de <i>C. neoformans</i> .....	49
5.4.1.3	Procedimentos da extração para obtenção das partículas de melanina .....	49

5.4.1.4	Tindalização parcial .....	50
5.4.1.5	Padronização da quantidade das partículas de melanina .....	51
<b>5.4.2</b>	<b>Preparo do meio de cultura ágar Müller-Hinton suplementado com 2,0% de glicose e 0,5 µg/mL de azul de metileno para os testes de sensibilidade aos antifúngicos com e sem adição de melanina .....</b>	<b>51</b>
<b>5.4.3</b>	<b>Método de difusão em agar a partir de disco .....</b>	<b>51</b>
5.4.3.1	Preparo do inóculo .....	52
5.4.3.2	Procedimentos de inoculação do meio agar Müller-Hinton suplementado ..	52
5.4.3.3	Condições de incubação e leitura das placas do teste de difusão a partir de disco .....	52
<b>5.4.4</b>	<b>Método de difusão em agar a partir de disco em meio melanizado .....</b>	<b>53</b>
5.4.4.1	Preparo do inóculo e do meio agar Müller-Hinton suplementado – difusão em agar a partir de disco em meio melanizado .....	53
5.4.4.2	Procedimentos de inoculação do meio agar Müller-Hinton suplementado – difusão em agar a partir de disco em meio melanizado .....	53
5.4.4.3	Condições de incubação e leitura das placas do teste de difusão a partir de disco em meio melanizado .....	54
<b>5.4.5</b>	<b>Método difusão em agar a partir de fita (E-test®) .....</b>	<b>54</b>
5.4.5.1	Preparo do inóculo e do meio agar Müller-Hinton suplementado – difusão em agar a partir de fita (E-test®) .....	54
5.4.5.2	Procedimentos de inoculação do meio agar Müller-Hinton suplementado – difusão em agar a partir de fita (E-test®) .....	54
5.4.5.3	Condições de incubação e leitura das placas do teste de difusão em agar a partir de fita (E-test®) .....	55
<b>5.4.6</b>	<b>Método difusão em agar a partir de fita (E-test®) em meio melanizado .</b>	<b>55</b>
5.4.6.1	Preparo do inóculo e do meio agar Müller-Hinton suplementado – difusão em agar a partir de fita (E-test®) em meio melanizado .....	55
5.4.6.2	Procedimentos de inoculação do meio agar Müller-Hinton suplementado – difusão em agar a partir de fita (E-test®) em meio melanizado .....	55
5.4.6.3	Condições de incubação e leitura das placas .....	56
<b>5.5</b>	<b>INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS .....</b>	<b>56</b>
<b>5.5.1</b>	<b>Produção de melanina em meio sólido sob diferentes condições de cultivo .....</b>	<b>56</b>
<b>5.5.2</b>	<b>Avaliação da produção de melanina por meio da eletroforese em gel PAGE não-desnaturante .....</b>	<b>57</b>

<b>5.5.3</b>	<b>Sensibilidade aos antifúngicos .....</b>	<b>57</b>
5.5.3.1	Método de difusão em agar a partir de disco com e sem adição de melanina .....	57
5.5.3.2	Método difusão em agar a partir de fita (E-test®) com e sem adição de melanina .....	58
5.6	DEFINIÇÕES QUANTO AO PERFIL DE SENSIBILIDADE .....	59
<b>6</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>60</b>
6. 1	PRODUÇÃO DE MELANINA EM MEIO SÓLIDO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	60
6. 2	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MELANINA POR MEIO DA ELETROFORESE EM GEL PAGE NÃO-DESNATURANTE .....	65
<b>6.2.1</b>	<b>Resultados da etapa de extração das amostras de <i>Cryptococcus neoformans</i> .....</b>	<b>65</b>
<b>6.2.2</b>	<b>Quantificação de melanina das amostras de <i>C. neoformans</i> obtidas a partir das bandas do gel de poliacrilamida .....</b>	<b>66</b>
6.3	SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS .....	69
<b>6.3.1</b>	<b>Obtenção das partículas de melanina .....</b>	<b>69</b>
6.3.1.1	Tindalização parcial .....	70
<b>6.3.2</b>	<b>Teste de sensibilidade a antifúngicos por difusão em agar a partir de disco com e sem adição de melanina .....</b>	<b>70</b>
6.3.2.1	Classificação das amostras quanto à sensibilidade aos antifúngicos na metodologia de difusão em agar a partir de disco .....	72
<b>6.3.3</b>	<b>Teste de sensibilidade a antifúngicos por difusão em agar a partir de fita (E-test®) com e sem adição de melanina .....</b>	<b>74</b>
6.3.3.1	Classificação das amostras quanto à sensibilidade aos antifúngicos na metodologia de difusão em agar a partir de fita (E-test®) .....	76
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>80</b>
7.1	PRODUÇÃO DE MELANINA EM MEIO SÓLIDO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	80
7.2	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MELANINA POR MEIO DA ELETROFORESE EM GEL PAGE NÃO-DESNATURANTE .....	82
7.3	SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS .....	85
<b>7.3.1</b>	<b>Obtenção das partículas de melanina e tindalização parcial .....</b>	<b>85</b>
<b>7.3.2</b>	<b>Método de difusão em agar a partir de disco com e sem adição de melanina .....</b>	<b>85</b>

<b>7.3.3</b>	<b>Método de difusão em agar a partir de fita (E-test<sup>®</sup>) com e sem adição de melanina .....</b>	<b>88</b>
<b>7.3.4</b>	<b>Considerações finais .....</b>	<b>91</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>92</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>94</b>
	<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>117</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>118</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A criptococose é infecção fúngica causada pelo *Cryptococcus neoformans*, levedura de caráter oportunista, pois atinge hospedeiros imunocomprometidos quer seja por causa de transplantes - entre 2,8 a 5% dos pacientes (JABBOUR et al., 1996; HUSAIN; WAGENER; SINGH, 2001), quimioterapia, AIDS - 5 a 10% dos pacientes (HELLOU et al., 1999; BRASIL, 2006), uso indiscriminado de antimicrobianos de largo espectro, uso crônico de corticóides ou prática de procedimentos médicos invasivos (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004).

A criptococose atinge primariamente os pulmões e pode se agravar chegando ao sistema nervoso central, devido ao neurotropismo da levedura, causando meningoencefalites. (BARKER, 1976; MITCHELL; PERFECT, 1995; CASADEVALL; PERFECT, 1998; FERNANDES et al., 2000).

Pacientes imunocompetentes também podem desenvolver criptococose (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; MITCHELL, et al., 1995; ZHU et al., 2002; KOKTURK et al., 2005; BARBOSA et al., 2006; CHEN et al., 2008), porém ainda não é possível afirmar que a infecção desenvolve-se devido às características de virulência do patógeno, a deficiências do organismo hospedeiro ou à combinação de ambos (BLACKSTOCK et al., 1999). Também existem relatos de criptococose em pacientes HIV-negativos associada à tuberculose (KOKTURK et al., 2005), diabetes melitus e hepatite crônica (DARZÉ et al., 2000).

*Cryptococcus neoformans* é levedura esférica e encapsulada que se reproduz assexuadamente, por brotamento, podendo ser encontrada, na natureza, em solos altamente nitrogenados tais como os locais onde ocorre acúmulo de fezes de pombos, folhas, flores e madeira em decomposição (KWON-CHUNG; BENNETT, 1984; KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; PEDROSO et al., 2007).

Este fungo na sua fase sexuada ou teleomórfica é um basidiomiceto pertencente ao gênero *Filobasidiella* que pode se reproduzir sexuada e ou assexuadamente gerando descendentes mating type  $\alpha$  ou a (CASADEVALL; PERFECT, 1998).

Uma característica associada à virulência de *C. neoformans*, é a capacidade que esta levedura apresenta de permanecer viável, por anos, em excrementos secos de pombos, considerados reservatórios de partículas infectantes que podem ser inaladas por apresentarem cápsula reduzida, podendo atingir os alvéolos pulmonares (BARONI et al., 2006), porém não

há consenso se a infecção origina-se pela inalação dos basidiósporos ou dos conídios espalhados pelo ar (LACAZ et al., 2002).

*Cryptococcus neoformans* apresenta duas variedades: *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii*. Franzot, Salkin e Casadevall (1999) descrevem nova variedade, *C. neoformans* var. *grubii*, baseados em análises genéticas que mostram diferenças moleculares significantes entre os sorotipos A e D de *C. neoformans* var. *neoformans*.

Ainda com relação à variedade das leveduras, Boekhout e colaboradores (2001) após encontrar diferenças fenotípicas, bioquímicas, clínicas e moleculares entre *C. neoformans* var. *neoformans*, *C. neoformans* var. *gattii* e *C. neoformans* var. *grubii* propõe a existência de duas espécies, *C. neoformans* (Sanfelice) Vuillemin e *C. bacillisporus* Kwon-Chung. No trabalho de Kwon-Chung e colaboradores (2004) atribuiu-se a *C. neoformans* var. *gattii* o status de espécie, passando a ser denominado *C. gattii*.

As variedades de *C. neoformans* podem ser divididas nos sorotipos A, B, C, D e AD, os quais resultam de diferenças estruturais na cápsula polissacarídica. A princípio, *C. neoformans* var. *neoformans* era composto pelos sorotipos A, D e AD e *C. gattii* pelos sorotipos B e C (KWON-CHUNG; POLACHECK; BENNETT, 1982); após descrição da nova variedade por Franzot, Salkin e Casadevall (1999), o sorotipo A corresponde à *C. neoformans* var. *grubii* e os sorotipos D e AD a *C. neoformans* var. *neoformans* (WILSON; BENNETT; BALLEY, 1968; BENNETT; KWON-CHUNG; THEODORE; 1978; IKEDA et al., 1982; CHERNIAK; SUNDSTROM, 1994; HEITMAN; LIN, 2006).

A epidemiologia da criptococose é de grande interesse, pois pode servir como informação sobre a patogênese do fungo e torna possível avaliar a gravidade da infecção à qual a população está exposta. *C. neoformans* var. *neoformans* é considerada cosmopolita enquanto a *C. gattii* é encontrada, tipicamente, em regiões tropicais e subtropicais e pode ser considerada endêmica na região nordeste do Brasil (ROZEMBAUM; GONÇALVES, 1994).

No Brasil, ocorre predominância do sorotipo A seguida de menor prevalência dos sorotipos B e D (LACAZ et al., 2002) e na África sub-Saariana, dentre os pacientes com AIDS, encontra-se *C. gattii* sorotipo C (LITVINTSEVA et al., 2005).

Os mecanismos de virulência de *C. neoformans* ainda não são completamente conhecidos, acreditando-se que múltiplos fatores possam estar envolvidos.

Os principais fatores associados à virulência são: a cápsula, “mating type”, a produção de manitol e enzimas (superóxido dismutase – SOD, fosfolipase, proteinase e fenoloxidase), e de melanina (BLACKSTOCK et al., 1999).

A cápsula apresenta constituição polissacarídica, com predomínio de glicuronoxilomanana, esta pode se desprender da levedura na forma de fragmentos que podem ser detectados nos fluidos corporais e, desta forma, pode também ser considerada como fator associado à virulência de *C. neoformans*. (KWON-CHUNG; RHODES, 1986; CHERNIAK, R. et al. 1998; BLACKSTOCK et al., 1999; BOSE et al., 2003).

*Cryptococcus neoformans* após descoberta da fase sexuada por Kwon-Chung (1975, 1976) passou a ser considerado basidiomiceto com dois tipos sexuais. O “mating type”, portanto, corresponde ao tipo sexual que a levedura apresenta durante o processo de transição para a forma filamentosa e provavelmente é mais uma característica que um fator associado à virulência. O “mating” (acasalamento) acontece quando leveduras de “matings” sexuais opostos ou do mesmo tipo são cultivados em condições de privação nutricional; ocorrendo, após o acasalamento, filamentação, meiose e esporulação. As amostras podem ser classificadas de acordo com o gene associado ao “mating” do tipo a ou  $\alpha$ , sendo consideradas mais virulentas as “mating”  $\alpha$  (KWON-CHUNG; EDMAN; WICKES, 1992; WICKES, 1996; WICKES, 2002; NIELSEN et al., 2005).

A produção de manitol, como fator associado à virulência, está relacionada a sua habilidade em inativar radicais livres que possam ser produzidos por mecanismos de defesa do hospedeiro (BLACKSTOCK et al., 1999).

A produção de enzimas como fatores associados à virulência pode ser explicada das seguintes formas:

As superóxido dismutases (SOD) são metaloenzimas que desempenham papel primário de proteção da levedura contra a ação de ânions superóxidos endógenos. Cinco isoformas da enzima já foram descritas, sendo Cu-ZnSOD, MnSOD e FeSOD as mais estudadas. O papel da SOD na patogênese de fungos não é claro, mas sugere-se estar associado a sua propriedade antioxidante (HAMILTON; HOLDOM 1997; HAMILTON; HOLDOM 1999; COX et al., 2003; NARASIPURA; AULT, 2003; DIAS et al., 2006a).

As fosfolipases constituem um grupo heterogêneo de enzimas capazes de hidrolisar uma ou mais ligações do tipo éster em glicerofosfolipídeos, resultando na desestabilização da membrana com conseqüente lise celular (CHEN et al., 1997; COX et al., 2001); já foram detectadas no sobrenadante de cultura de *C. neoformans* com temperatura ótima para produção a 30°C, sendo secretada quando a levedura é cultivada a 37°C (WRIGHT et al., 2002).

As proteinases podem ser produzidas pelo patógeno com a finalidade de degradar as proteínas do hospedeiro, tais como, colágeno, elastina, fibrinogênio, imunoglobulinas e

fatores do complemento, causando assim danos ao tecido e gerando nutrientes para a levedura (BRUESKE, 1986; CHEN; BLANK; CASADEVALL, 1996; STEENBERGEN; CASADEVALL; 2003).

A fenoloxidase é uma lacase e está relacionada à melanização das células e, dentre os fatores associados à virulência, é considerado um dos mais importantes. As células melanizadas são, geralmente, menos susceptíveis aos antimicrobianos e agentes oxidantes, além de serem capazes de burlar o sistema imune do hospedeiro e de “inativar” os fármacos usados normalmente na terapêutica (KWON-CHUNG; POLACHECK; POPKIN, 1982; KWON-CHUNG; RHODES, 1986; JACOBSON; EMERY, 1991; IKEDA et al., 1993; WILLIAMSON, 1994; LIU; TEWARI; WILLIAMSON, 1999).

Mais estudos das relações entre condições de cultivo com a expressão da lacase em *C. neoformans* devem ser realizados, utilizando diferentes pH no meio de cultura e temperaturas de incubação, pois podem gerar informações sobre o comportamento da levedura e possíveis alvos para desenvolvimento de antifúngicos. A atividade da fenoloxidase em *C. neoformans* é aumentada em condições de privação de glicose, presença de íons  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , aminoácidos (glutamina e asparagina),  $\text{FH}_4$  e esculina; e não sofre interferência de  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NH}_3$  (POLACHECK; HEARING; KWON-CHUNG, 1982; CASADEVALL; PERFECT, 1998). Com relação à temperatura Jacobson e Emery (1991) relatou a redução acentuada da atividade enzimática em amostras de origem clínica e principalmente em amostras ambientais após incubação a 37°C.

A melanina, pigmento insolúvel de carga negativa pode variar entre as cores marrom e negra e sua produção deve-se à polimerização oxidativa de compostos fenólicos. E algumas das propriedades envolvidas na virulência são: proteção contra oxidantes, inibição da fagocitose, interferência na resposta inflamatória, redução da sensibilidade a anfotericina B, resistência ao frio e calor, confere carga negativa a célula fúngica e proteção contra luz UV dentre várias ações e efeitos já relatados (SHAW; KAPICA, 1972; CHASKES; TYNDALL, 1975; CHASKES; TYNDALL, 1978; POLACHECK; KWON-CHUNG, 1988; JACOBSON; EMERY, 1991; WANG; CASADEVALL, 1994 a e b; WANG; AISEN; CASADEVALL, 1995; NOSANCHUK; CASADEVALL, 1997; CASADEVALL; PERFECT, 1998; STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003; PLONKA; GRABACKA, 2006).

A investigação da presença e quantificação da lacase em *C. neoformans* pode originar informações relevantes quanto à produção de melanina em diferentes amostras desta levedura e, portanto, torna-se importante objeto de estudo para compreensão deste fator associado à virulência. Ikeda et al. (2002) estudou a lacase e a melanização de diferentes amostras de

*Cryptococcus* através da eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante, eles observaram migrações mais lentas no gel das lacases produzidas por *C. albidus*, *C. laurentii* e *C. curvatus* que também apresentaram menor atividade quando comparado a lacase de *C. neoformans*. Atualmente essa técnica aprimorada vem sendo amplamente empregada no estudo das enzimas associadas à virulência (LATOUCHE; SORRELL; MEYER, 2002; RODRIGUES et al., 2003).

A terapêutica da criptococose baseou-se, por décadas, apenas no emprego de anfotericina B, porém devido a sua toxicidade passou, em alguns casos, a ser usada em associação com 5-fluorocitosina (CASADEVALL; PERFECT, 1998).

Algumas formulações lipídicas de anfotericina B têm sido desenvolvidas para facilitar sua liberação, reduzir sua toxicidade e permitir que altas doses sejam toleradas, porém são medicações de elevado custo (MARTINEZ, 2006).

A 5-fluorocitosina foi utilizada inicialmente no tratamento da meningite criptocócica com bons resultados, porém o crescente número de casos de meningite levou à seleção de leveduras resistentes; desta forma, seu uso ficou restrito à associação com anfotericina B (CASADEVALL; PERFECT, 1998).

O tratamento recomendado para pacientes imunocompetentes e com AIDS portadores de criptococose é anfotericina B na fase aguda e fluconazol na fase de manutenção ou profilática (SAAG et al., 1992; BRASIL, 2008).

Dentre as drogas azólicas de uso sistêmico, segundo a revisão de Martinez (2006) o itraconazol e o cetoconazol não são recomendados no tratamento da meningite criptocócica, pois não apresentam boa biodisponibilidade e não alcançam níveis desejáveis no líquido cefalorraquidiano; o voriconazol é utilizado por via oral ou endovenosa, sendo contra-indicado em casos de insuficiência hepática e renal.

O novo azólico, posaconazol, está em fase de estudos *in vitro* para avaliação contra fungos filamentosos e leveduras apresentando excelente atividade contra *C. neoformans* (BARCHIESI et al., 2001; HOF, 2006). Preparações comerciais nas apresentações disco e E-test<sup>®</sup> do posaconazol e anfotericina B foram estudadas comparativamente seguindo as metodologias de difusão em agar e microdiluição (M27-A2 e M38-A) por Espinel-Ingroff (2006) contra *Zygomycetos*, *Aspergillus* spp., *Candida* spp. e *C. neoformans*; os resultados indicaram a possibilidade de aplicação dos antifúngicos estudados na rotina laboratorial frente aos microrganismos testados. Torres-Rodrigues e colaboradores (2008) avaliou comparativamente as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de 80 amostras de *C. neoformans* e *C. gattii* obtidas por microdiluição dos azóis: fluconazol, voriconazol e o

posaconazol encontrando baixo nível de resistência. Em fase de estudos pré-clínicos (Fase 3) no tratamento de infecções fúngicas estão quatro agentes: isavuconazol, ravuconazol, aminocandina e albaconazol, apresentando este último potente atividade contra *Cryptococcus* (PASQUALOTTO; DENNING, 2008).

A escolha do melhor tratamento está associada, principalmente, à causa da imunossupressão e ao local de instalação da infecção, porém o tratamento com combinação de anfotericina B e 5-fluorocitosina tem apresentado os melhores resultados, mesmo para pacientes com AIDS (MITCHELL; PERFECT, 1995; SAAG, et al., 2000; JOHNSON M. D.; PERFECT, 2007).

A avaliação da sensibilidade aos antifúngicos de diferentes amostras de *C. neoformans* é de interesse terapêutico, pois é crescente o número de infecções fúngicas. O fluconazol e a anfotericina B foram escolhidos para execução dos testes por serem os fármacos de escolha no tratamento da criptococose pulmonar e sistêmica em pacientes imunocompetentes e imunodeprimidos (SAAG et al., 1992; SAAG et al., 2002; MARTINEZ, 2006; BRASIL, 2008).

A instituição responsável pela elaboração de propostas de padronização para os testes de sensibilidade nos Estados Unidos é o CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), chamado anteriormente de NCCLS (National Committee for Clinical laboratory Standards) que através dos documentos M27-A (CLSI, 1997) e M27-A2 (CLSI, 2002) padronizam a macro e a microdiluição com a finalidade de obter resultados rápidos, confiáveis e reprodutíveis para aplicação no monitoramento terapêutico.

O EUCAST (European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing) estabelece as condições para os testes de sensibilidade na Europa que assemelha-se ao proposto pelo CLSI, porém com algumas modificações no inóculo e meio de cultura.

Atualmente o documento M27-A2 (CLSI, 2002) descreve o método aceito como referência para avaliação de outras técnicas, como as difusões em agar a partir de disco e fita (Etest<sup>®</sup>) que são avaliadas quanto a porcentagem de concordância com a metodologia padrão; e quanto maior a concordância entre diferentes metodologias maior a confiabilidade e adesão dos laboratórios com implantação das metodologias alternativas na rotina.

Os testes mais utilizados para determinar a CIM são: diluição em meio líquido (macrodiluição e microdiluição) e difusão em ágar (meio sólido) a partir de discos e fitas.

O método de diluição em meio líquido consiste na diluição da droga no meio no qual será inoculado o microrganismo, podendo ser realizado em tubos (macrodiluição) ou em

placas de titulação (microdiluição) (ESPINEL-INGROFF et al., 1992; MOREIRA, 2003; PFALLER et al., 2005b).

A difusão em ágar pode ser realizada com discos conforme o documento M44, CLSI, 2004 ou fitas (E-test<sup>®</sup>), que difundem concentração fixa do antimicrobiano (disco) ou várias concentrações (fita) sobre meio de cultura previamente inoculado com microrganismos (COLOMBO et al., 1995; CHEN et al., 1996; SIMOR et al., 1997; PFALLER; MESSER; BOLMSTROM, 1998; VANDENBOSSCHE et al., 2002). Em torno do disco poderá haver formação de halo de inibição, sendo este resultado de caráter qualitativo e conforme tamanho das zonas de inibição, os microrganismos podem ser classificados em sensíveis, intermediários ou resistentes à determinada droga, e no caso da fita podem-se obter dados quantitativos referente à CIM (MOREIRA, 2003).

As metodologias padrões para teste de sensibilidade antifúngicas através da microdiluição são de fácil execução, economizam material de laboratório pela pequena quantidade de meio utilizada nos ensaios, produzem resultados confiáveis e reprodutíveis. A difusão em ágar a partir de disco apresenta a desvantagem de não permitir determinar a dose mínima de antifúngico necessária para eliminar o patógeno, pois apenas indica o perfil de sensibilidade do mesmo ao antimicrobiano em uma concentração específica; porém tem como vantagens, fácil execução da técnica que é de baixo custo e fácil implantação na rotina laboratorial. Comparando resultados de disco difusão com as metodologias de referência, Vandebossche e colaboradores (2002) observou que discos disponíveis comercialmente apresentaram baixa concordância, porém resultados com excelente concordância entre as metodologias foram obtidos no trabalho de Messer e colaboradores (2007).

O E-test<sup>®</sup> apresenta a vantagem de permitir a determinação da dosagem mínima de antimicrobiano necessária à inibição da ação do microrganismo permitindo minimizar os efeitos colaterais e tóxicos da medicação; a técnica é de fácil execução e implantação; têm apresentado resultados de elevada concordância com as metodologias padrões de microdiluição, sendo indicado como alternativa viável para execução de testes de sensibilidade antifúngica, porém tem elevado custo (VANDENBOSSCHE et al., 2002; DIAS et al., 2006b; MESSER et al., 2007).

## 2 OBJETIVOS

- Avaliar a produção de melanina por diferentes amostras de *C. neoformans* (amostras clínicas e ambientais) no cultivo em meio sólido sob diferentes condições de temperatura e pH.
- Investigar a aplicabilidade e desenvolver metodologia para estudo da lacase em *C. neoformans* por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) não-desnaturante.
- Avaliar a produção do pigmento melanínico em diferentes amostras de *C. neoformans* pela lacase expressa no gel PAGE não-desnaturante.
- Avaliar a influência da melanização no perfil de sensibilidade de *C. neoformans* através de diferentes metodologias (difusão em agar partir de disco e fita - E-test<sup>®</sup>) frente aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol.

### 3 JUSTIFICATIVA

Diante da crescente incidência de infecção oportunista causadas por *C.neoformans* que vem se agravando com o aumento do número de indivíduos imunodebilitados, principalmente decorrentes da síndrome da imunodeficiência (AIDS); sendo no Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde de 1980 a junho de 2007 registrados 474.273 casos de criptococose (BRASIL, 2007), tornam-se necessários maiores estudos para melhor compreensão do agente etiológico, da criptococose, bem como dos fatores associados à virulência envolvidos na patogênese deste microrganismo.

Como a capacidade de produção do pigmento melanínico e o nível de sua expressão estão fortemente associados às linhagens de maior virulência, sendo observada a presença de células melanizadas em amostras de infecções, faz-se importante a realização de estudos adicionais que avaliem a produção do pigmento entre amostras diferentes, sob condições variadas de cultivo e a relação desta produção com o mecanismo de ação de antifúngicos.

Além disso, é preciso desenvolver metodologias de simples execução para implementação na rotina laboratorial e também aprimorar o conhecimento do comportamento de diferentes amostras da levedura (diferentes virulências), nas mais variadas condições de cultivo, para avaliar a expressão dos seus diferentes fatores associados à virulência e a interação dos mesmos com os medicamentos utilizados na terapêutica da criptococose.

O aumento do conhecimento sobre *C. neoformans* pode servir como fontes de informações para que, no futuro, fármacos mais eficazes no tratamento da criptococose possam ser desenvolvidos e venham a substituir a terapêutica atual, muitas vezes associada à tratamentos prolongados, de elevados efeitos colaterais e toxicidade.

#### 4 REVISÃO DA LITERATURA

A patogenicidade é a capacidade ou habilidade de causar doença, e a patogênese das infecções microbianas geralmente está relacionada a três fatores: o estado do sistema imune do hospedeiro, a virulência do microrganismo, ou seja, propriedades inerentes ao micróbio e o tamanho do inóculo (MITCHELL; PERFECT, 1995; PELCZAR et al., 1997).

A resistência relativa a doenças fúngicas resulta da combinação das defesas do sistema imune com as relativamente elevadas temperaturas corporais (CASADEVALL; PIROFSKI, 1999; CASADEVALL; PIROFSKI, 2000; CASADEVALL; PIROFSKI, 2001; CASADEVALL; PIROFSKI, 2003; CASADEVALL, 2005).

*Cryptococcus neoformans* é patógeno de interesse para estudo dos fatores associados à virulência em fungos, pois causa infecções invasivas tanto em pacientes imunocompetentes quanto imunodebilitados, e pelo fato de ser capaz de crescer em temperaturas iguais ou superiores a 37°C (CASADEVALL; PERFECT, 1998). Os genes envolvidos no controle do crescimento a elevadas temperaturas ainda não foram totalmente identificados, estudos já confirmaram a existência de 20 genes essenciais, porém é previsto o envolvimento de mais de 100 genes (PERFECT, 2006).

Nas infecções provocadas por *C. neoformans*, os estudos de amostras isoladas mostram que existem diferentes níveis de virulência, os quais são justificados pela capacidade da levedura de produzir e expressar múltiplos fatores associados à virulência (KOZEL, 1995; HOGAN; KLEIN; LEVITZ, 1996; BUCHANAN; MURPHY, 1998; STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003).

Os principais fatores associados à virulência de *C. neoformans* são: a cápsula, o “mating type”, a produção de manitol e melanina (BLACKSTOCK et al., 1999). A produção de enzimas como superóxido dismutases, fosfolipases, ureases e lacases que são utilizadas como “armas” para muitas vezes lesionar o tecido hospedeiro, também tem sido considerada como importante fator relacionado à virulência do fungo (BUCHANAN; MURPHY, 1998; STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003).

Os fatores de virulência têm sido estudados *in vitro* e *in vivo* para elucidação de sua participação nas infecções causadas pelo *C. neoformans*. Por ser patógeno não específico podendo habitar outros fungos (p.ex.: *Dicyostelium discoideum*), vírus, bactérias (p.ex.: *Legionella pneumophila*), animais (p.ex.: besouro *Metoponorthus pruinosus*), protistas, algas

e plantas (CASADEVALL; STEENBERGEN; NOSANCHUK, 2003), estudos das interações patógeno-hospedeiro, dos genes relacionados aos fatores de virulência e a sensibilidade aos antifúngicos também têm sido realizados em modelos não-mamíferos na tentativa de estabelecer um modelo para trabalho em hospedeiro invertebrado, e como exemplos temos, o nematóide *Caenorhabditis elegans* utilizado por Tang e colaboradores (2005) e a larva do inseto *Galleria mellonella* por Mylonakis e colaboradores (2005).

Nesta revisão serão abordados os fatores de virulência que estão fortemente ligados à patogenicidade, tais como a cápsula e a produção de melanina e também o perfil de sensibilidade de *C. neoformans* aos antifúngicos utilizados na terapêutica.

Um dos primeiros trabalhos correlacionando a cápsula de *C. neoformans* com a virulência foi o trabalho de Bulmer, Sans e Gunn (1967) no qual amostras mutantes acapsuladas após meses de cultivo tornaram-se capsuladas e expressaram diferentes níveis de virulência.

A cápsula é composta, principalmente, por manoproteínas, galactoxilomananas e glicuronoxilomananas (GXM), sendo este último o principal componente entre 90 a 95%, e que está envolvido na supressão do sistema imune do hospedeiro. Um estudo para elucidação do mecanismo de imunossupressão relacionado com a GXM indicou que pelo menos dois mecanismos mediam a supressão não-específica: produção de IL-10 e diminuição do número de células T (KWON-CHUNG; RHODES, 1986; VECCHIARELLI et al., 1996; CHERNIAK, R. et al. 1998; RETINI et al., 1998; CHIAPELLO et al., 2001; MOYRAND et al., 2002; KOZEL et al., 2003).

No estudo de Walenkamp e colaboradores (1999) os componentes da cápsula apresentaram o mesmo padrão de citocinas frente a células mononucleares periféricas sanguíneas (TNF  $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL 10, IL-1 $\beta$ , IL-6 E IL-8) tanto para amostras de *C. neoformans* quanto para os componentes purificados da cápsula independente das diferenças estruturais.

Estudos sobre os genes envolvidos na produção da cápsula já identificaram e caracterizaram pelo menos quatro genes denominados: CAP64, CAP 60, CAP59 e CAP10 (CHANG; KWON-CHUNG, 1994; CHANG; PENOYER; KWON-CHUNG, 1996; CHANG; KWON-CHUNG, 1998; CHANG; KWON-CHUNG, 1999; WILDER, et al., 2002; STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003; JANBON, 2004). Genes não-essenciais à formação da cápsula, mas que podem originar alterações em sua estrutura uma vez que estão envolvidos na formação e composição da GMX já foram descobertos e denominados: CAS1, CAS3, UXS1, CAS31 a CAS35 e CMT1; e com a disponibilidade do genoma do *Cryptococcus* outras famílias de genes relacionadas com a produção da cápsula têm sido

identificadas (JANBON, et al., 2001; MOYRAND et al., 2002; BOSE et al., 2003; SOMMER et al., 2003; AKOH et al., 2004; JANBON, 2004; MOYRAND et al., 2004; McFADDEN; ZARAGOZA; CASADEVALL, 2006).

O tamanho da cápsula de *C. neoformans* também está relacionado com a virulência, uma vez que em processos infecciosos encontra-se aumentado e estudos para elucidação das condições e fatores envolvidos no crescimento da cápsula mostram que o mesmo pode ser induzido por fatores ambientais como privação severa de ferro, conforme trabalho de Lian e colaboradores (2005) que verificaram aumento na transcrição do gene CAP 60 e de genes codificantes de permeases de íons ferro; por exposição ao  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  em níveis fisiológicos (GRANGER; PERFECT; DURACK, 1985) e exposição a soro de mamíferos ou dióxido de carbono (ZARAGOZA; FRIES; CASADEVALL, 2003).

A cápsula apresenta constituição polissacarídica heterogênea e muitas propriedades biológicas que contribuem para a virulência, sendo a inibição da fagocitose uma das mais importantes; a comprovação de tais habilidades demonstra-se por estudos com amostras mutantes que por não serem capazes de sintetizar a cápsula, tornam-se avirulentas e são rapidamente fagocitadas (BULMER; SANS, 1968; KOZEL, 1995). No trabalho de Cleare e colaboradores (1999) amostras com variações estruturais nos açúcares constituintes da cápsula também apresentaram menor virulência. Kozel e colaboradores (2003) em estudos sobre a composição e estrutura química da cápsula mostraram que *O*-acetilação e ou xilosilação são importantes para a ligação de anticorpos monoclonais anti-GMX, ativação do complemento e para acumulação tecidual de GMX, porém não interfere na fagocitose por neutrófilos.

A cápsula inibe a fagocitose por macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e também inibe a internalização por células endoteliais (DIAMOND; ROOT; BENNETT, 1972; DIAMOND; BENNETT, 1973; KOZEL; HIGHISON; STRATTON, 1984; GRANGER; PERFECT; DURACK, 1985; BOLAÑOS; MITCHELL, 1989; LEVITZ; DIBENEDETTO, 1989; LEVITZ; FARRELL, 1990; IBRAHIM, 1995; DONG; MURPHY, 1997; MURPHY, 1998; VECCHIARELLI et al., 2003; Del POETA, 2004; SCHOP, 2007), além de inibir a fagocitose, partes da cápsula que se desprendem da levedura e passam a circular pelos fluidos corporais, se fagocitadas por macrófagos, podem acumular-se no citoplasma, e, provocar assim uma disfunção celular ou até morte do mesmo; no sistema nervoso central os fragmentos polissacarídicos capsulares alteram o metabolismo da água, podendo provocar complicações, como aumento da pressão intracraniana, originando assim dores de cabeça, alterações visuais e eventualmente morte; e seu acúmulo na corrente sangüínea está também

associado com a diminuição da migração de leucócitos para o local da inflamação (KOZEL; MASTROIANNI, 1976; KOZEL, 1977; CHERNIAK; SUNDSTROM, 1994; KOZEL, 1995; STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003).

Amostras de *C. neoformans* encapsuladas são ativadoras do sistema do complemento, e quando incubada com soro, ocorre deposição de C3 na superfície da cápsula ou no interior em regiões próximas à superfície (KOZEL et al., 1988; KOZEL et al., 1989), sendo menor a eficácia da fagocitose mediada pelo complemento quanto maior o tamanho da cápsula, contudo esta não é afetada pelo tamanho quando há opsonização por anticorpos. Amostras cultivadas *in vitro* e *in vivo* exibem cápsulas com diferentes estruturas de GMX, e conseqüentemente, diferentes processos fagocítico (ZHONG; PIROFSKI, 1998; GATES; THORKILDSON; KOZEL, 2004). Portanto, a fagocitose da cápsula de *C. neoformans* depende de fatores, tais como, tamanho, estrutura, composição, presença ou ausência de soro e origem da célula fagocítica (Del POETA, 2004).

Dentre os fatores de virulência, a produção de melanina ou melanogênese tem merecido destaque, em virtude da relação existente entre seu nível de expressão com a virulência, uma vez que amostras de elevada virulência isoladas têm apresentado a característica de produzir elevadas quantidades de melanina (BLACKSTOCK et al., 1999) o que tem sido comprovado em estudos nos quais amostras de elevada virulência, ao terem o gene relacionado com a produção de melanina destruído, acabam se tornando menos virulentas (KWON-CHUNG; POLACHECK; POPKIN, 1982; KWON-CHUNG; RHODES, 1986). A contribuição da melanina na virulência acredita-se estar relacionada com a redução da sensibilidade do patógeno à morte no hospedeiro e por influenciar na resposta imune à infecção (WILLIAMSON, 1997; NOSANCHUCK; CASADEVALL, 2003; NOSANCHUCK; CASADEVALL, 2006).

A melanina é pigmento produzido por ampla variedade de seres vivos, desde procariotos até vertebrados superiores e os vários tipos de melaninas são indícios da importância da melanogênese como mecanismo de adaptação às variadas condições ambientais na terra, porém pouco é conhecido sobre a estrutura das melaninas, uma vez que as técnicas bioanalíticas disponíveis não são capazes de elucidar a estrutura do monômero que compõe este complexo polímero (NOSANCHUCK; CASADEVALL, 2003; PLONKA; GRABACKA, 2006).

A síntese de melanina em mamíferos ocorre via tirosinase a partir da tirosina ou dihidroxifenilalanina (BEEL; WHEELER, 1986; WAKAMATSU; ITO, 2002; LANGFELDER et al., 2003; NOSANCHUCK; CASADEVALL, 2003; PLONKA;

GRABACKA, 2006). Em microrganismos via fenoloxidasas (tirosinases, catecolases ou lacases) ou via policetídeos sintase (LANGFELDER et al., 2003; SCHIAVE, 2007).

Para uma substância ser caracterizada como melanina os critérios são: apresentar cor escura (marrom ou negra) ou avermelhada, insolubilidade em solventes orgânicos ou aquosos, resistência a ácidos concentrados e clareamento por agentes oxidantes, solubilização e degradação por soluções alcalinas, presença de centros persistentes de radicais livres na molécula e capacidade de ligação a íons multivalentes (CASADEVALL; ROSAS; NOSANCHUK, 2000; NOSANCHUCK; CASADEVALL, 2003; MEREDITH; SARNA, 2006; SCHIAVE, 2007). Assim, a melanina é um pigmento hidrofóbico, de cor marrom à preta, carregado negativamente e de alto peso molecular que é formado pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos e podem ser classificadas e divididas em três grupos principais: eumelaninas, feomelaninas e alomelaninas (PLONKA; GRABACKA, 2006).

As eumelaninas originam-se da 3,4-dihidroxifenilalanina (dopa) por oxidação da tirosina e ou fenilalanina e apresentam coloração de marrom a negra. As feomelaninas são sintetizadas a partir da dopa e cisteína, com início de síntese semelhante a das eumelaninas, e sua coloração varia entre amarela à vermelha. As alomelaninas constituem um grupo heterogêneo de melaninas de coloração marrom, e podem originar-se de procesos de oxidação e polimerização dos seguintes substratos:  $\gamma$ -glutaminil-4-hidroxibenzeno, catecóis, ácido 4-hidroxifenilacético, tetrahidroxinaftaleno e ácido homogentísico. Este último, por ação de tirosinases, origina as melaninas chamadas de piomelaninas. Melaninas originadas do acetato via policetideosintase são denominadas melaninas do dihidroxinaftaleno e apresentam cor variando de marrom à negra (NOSANCHUCK; CASADEVALL, 2006; PLONKA; GRABACKA, 2006).

A biossíntese da melanina em *C. neoformans* ocorre via L-dopa-melanina cuja rota de síntese apresenta a lacase como enzima central como várias proteínas associadas e tem sido alvo de estudos para que possam ser identificadas as principais enzimas envolvidas na sua regulação e expressão que ainda permanecem desconhecidas (WILLIAMSON, 1997; WILLIAMSON et al., 1998; ZHU; WILLIAMSON, 2003; WALTON; IDNURM; HEITMAN, 2005), é dependente de uma metaloenzima - a lacase, que é uma fenoloxidase ou difenol oxidase porque é capaz de oxidar compostos difenólicos, diamino (NURUDEEN; AHEARN, 1979; KOZEL, 1995) e ferro (ZHU; WILLIAMSON, 2004). Nas infecções do SNC por *C. neoformans*, a melanina é produzida pela conversão de catecolaminas, tais como dopamina, norepinefrina e epinefrina (POLACHECK; PLATT; ARONOVITCH, 1990; CASADEVALL; ROSAS; NOSANCHUK, 2000).

Após análise filogenética de 48 genes homólogos de lacases fúngicas realizado por Valderrama e colaboradores (2003) foi sugerido que *Filobasidiella neoformans* e *Aspergillus nidulans* não produzem lacases verdadeiras, apesar de utilizarem substratos típicos do grupo, porque não pertencem ao mesmo grupo evolutivo das *bona fide* lacases (lacases autênticas).

Quanto à localização a lacase foi encontrada inicialmente ligada covalentemente à parede celular por ligações de dissulfeto ou tioéster (ZHU et al., 2001) e sua regulação depende de sinais ambientais como condições nutricionais, presença de cátions multivalentes e temperatura (ZHU et al., 2004). Porém amostras com mutações nos genes da quitinase apresentam parede celular que permitem extravasamento da lacase para o meio (WALTON ; IDNURM; HEITMAN, 2005). Nas células de *C. neoformans* foram observadas também a presença de duas isoformas da enzima (Lac1 e Lac2) com diferentes localizações, Lac1 na parede celular, e Lac2 no citoplasma podendo ter alterada sua localização na ausência da Lac1 (MISSALL et al., 2005), também foram observadas diferentes especificidades para substratos nas células estudadas, sugerindo o envolvimento de múltiplas lacases para aumentar a eficiência do processo de melanização em *C. neoformans* o que deve-se à diversidade de substratos encontrados na natureza (PUKKILA-WORLEY et al., 2005).

Considerado um alvo potencial para o desenvolvimento de novos fármacos, o gene que codifica a lacase foi clonado e denominado inicialmente de CNLAC1 (WILLIAMSON, 1997). Zhu e Williamson (2003) identificaram um gene para canais de cloro (CLC-A) essencial para funcionamento da lacase, sendo os mutantes restaurados quanto à produção de melanina após complementados com o gene da amostra selvagem, além disso foi observado que tais mutantes apresentavam redução da síntese da cápsula e baixo crescimento em pH elevado, resultando em atenuação da virulência em camundongos.

Posteriormente identificou-se um gene homólogo chamado CNLAC2, porém o CNLAC1 é dominante e expresso sob condições de privação de glicose (ZHU; WILLIAMSON, 2004). Recentemente Pukkila-Worley e colaboradores (2005) mostraram que, embora transcrito em menor nível, o gene CNLAC2 agora chamado de LAC2 é também induzido por privação de glicose e superexpresso em caso de mutação do gene CNLAC1 agora chamado de LAC1. Também foram descobertos quatro novos alelos mutantes do gene LAC1, o qual apresenta possível predisposição para inserção de genes promotores, podendo ser alvo de manipulação; além disso, foram identificados cinco novos genes dos quais depende a melanização de *C. neoformans* (WALTON; IDNURM; HEITMAN, 2005).

O estudo de Tanaka e colaboradores (2005) para análise filogenética do gene LAC1 em 64 amostras de *C. neoformans* abrangendo as três variedades comprovaram: a similaridade

entre amostras que foram distribuídas dentro das variedades, revelou que *C. neoformans* var. *grubii* e *C. neoformans* var. *neoformans* apresentaram as menores diferenças nas seqüências de nucleotídeos estudados e que amostras deficientes na produção de melanina apresentaram seqüências homologas às melanogênicas do mesmo sorotipo, sugerindo que esta deve-se a baixa transcrição do gene da lacase e não a falta do mesmo.

Um fato que torna importante o estudo da melanina e dos fatores envolvidos na sua síntese é o fato da lacase não ser uma enzima exclusiva da levedura, assim sendo, a lacase, não é exclusiva do *C. neoformans*, e também já foi encontrada em outras espécies isoladas na clínica, embora com menor atividade segundo o trabalho de Ikeda e colaboradores (2002), portanto é candidata a ser alvo para desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da criptococcose, bem como de outros microrganismos que utilizam a melanina como fator de virulência, tais como: *Wangiella dermatitidis* e *Mycobacterium lepra*. (WANG; AISEN; CASADEVALL, 1995; WILLIAMSON, 1997). A lacase além de estar envolvida na produção de melanina também apresenta a propriedade de conferir proteção para a levedura, uma vez que é capaz de inibir a formação de radicais hidroxilas produzidos nos macrófagos através de oxidação dependente de ferro (LIU; TEWARI; WILLIAMSON, 1999).

A melanina desempenha papéis importantes na patogênese de *C. neoformans*. Ela protege a levedura contra o mecanismo de defesa do hospedeiro, através da neutralização de superóxidos e substâncias oxidantes produzidas por macrófagos (derivados oxidativos de nitrogênio e oxigênio) e foi constatado que as leveduras melanizadas foram menos afetadas que as não-melanizadas (WANG; CASADEVALL, 1994a). Em estudos Mandal e colaboradores (2007), por meio de técnicas de microscopia eletrônica, correlacionaram o tamanho e a estrutura da parede celular com a melanina produzida por amostras clínicas melanizadas e albinas de *C. neoformans* isoladas de 43 pacientes e constataram que as diferenças de tamanho das células melanizadas (dobro das albinas) e na estrutura da parede (com camada de melanina ocupando 75% da estrutura) deviam-se à melanina depositada que estavam relacionadas à elevada virulência e a proteção contra antifúngicos.

Um outro papel da melanina é a associação com doenças no sistema nervoso central (SNC) e outras funções atribuídas são: proteção contra raios UV e diminuição da sensibilidade a antifúngicos, aos metais pesados como, por exemplo, a prata (GARCIA-RIVERA; CASADEVALL, 2001; GÓMEZ; NOSANCHUK, 2003) e aos mecanismos de defesa do sistema imune do hospedeiro (KOZEL, 1995; WILLIAMSON, 1997; LANGFELDER et al., 2003; STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003). Ela apresenta

propriedades imunomodulatórias que podem influenciar a resposta imune na infecção, o que contribui para a virulência (MEDNICK et al., 2005).

A melanina protege a levedura, no meio ambiente, contra degradação enzimática de outros microrganismos, pois a torna menos susceptível a ação de enzimas hidrolíticas (ROSAS; CASADEVALL, 2000), além disso, também protege contra os extremos de temperatura, sendo a proteção mais efetiva nas células melanizadas que não-melanizadas (ROSAS; CASADEVALL, 1997) e segundo trabalho de Dadachova e colaboradores (2007) a melanina após exposição à radiação ionizante e outras radiações eletromagnéticas altera suas propriedades eletrônicas, e as amostras melanizadas de *C. neoformans* apresentam aumento de crescimento frente às amostras não-melanizadas, os autores então sugerem que a melanina confere às células a capacidade de capturar por suas propriedades oxidante-redutoras a radiação e passar a utilizá-la como fonte de energia em seus processos metabólicos.

Em *C. neoformans* a síntese de melanina está condicionada à presença de substrato exógeno e nem todos os pigmentos originados seguem os critérios estabelecidos para ser considerados “melanina” (GARCIA-RIVERA et al., 2005). E, baseado nesta necessidade de substrato, está fundamentado o paradigma da melanização de *C. neoformans* no meio ambiente, que começa a ser esclarecido em estudos nos quais o fungo mostra-se capaz de utilizar metabólitos de outros microrganismos como o ácido homogentísico, precursor da síntese de melanina em bactérias (FRASES et al., 2007), dando indícios de que interações entre microrganismos possam estar acontecendo no meio ambiente, uma outra observação que comprova tais indícios aconteceu no trabalho de Frases e colaboradores (2006) que descreveram a produção e liberação de dopamina para o meio líquido produzida pela bactéria Gram negativa *Klebsiella aerogenes* com conseqüente escurecimento das células de *C. neoformans* de todos os sorotipos.

A melanina está envolvida na questão da sensibilidade aos tratamentos antifúngicos conforme descrito por Wang e Casadevall (1994b) e Van Duin; Casadevall; Nosanchuk (2002) que relatam a redução da sensibilidade a anfotericina B em amostras melanizadas. Estudo de Ikeda e colaboradores (2003) avaliando a melanina como fator de resistência antifúngica frente a anfotericina B e fluconazol com amostras de *C. neoformans* e *C. albidus* mostrou que não houve alteração da concentração inibitória mínima (CIM) das amostras melanizadas, porém quando investigaram os poços com amostras inibidas, eles notaram que apenas células de *C. neoformans* melanizadas estavam vivas e mostraram-se mais “resistentes” em estudos de tempo de morte microbiana frente anfotericina B e, avaliando a presença de droga livre no meio de cultura observou redução da concentração da anfotericina B apenas na presença de

células melanizadas, sugerindo deposição da mesma na parede celular, porém com relação ao fluconazol não foi observada alteração da concentração na presença de melanina.

Os primeiros testes de sensibilidade a antifúngicos realizados no Brasil conforme a metodologia do CLSI (M27-P, 1992) foram realizados por Franzot e Hamdan (1996) com 53 amostras de *C. neoformans* de origem clínica e ambiental frente aos antifúngicos anfotericina B, 5-fluorocitosina, cetoconazol, fluconazol e itraconazol, obtendo resultados homogêneos e com CIMs comparáveis para os amostras clínicos e ambientais que serviram como referência para comparação com estudos *in vitro* posteriores.

As condições físico-químicas e os parâmetros para realização dos testes devem ser bem definidos e verificados, pois podem interferir no desempenho das amostras e/ou nas drogas estudadas, alterando assim os resultados como verificado no trabalho de Dorsthorst e colaboradores (2005) que comprovaram a influência de diferentes pHs nas CIMs e na atividade da anfotericina B e flucitosina frente à diferentes amostras fúngicas em meio RPMI 1640 nos tampões citrato, fosfato-citrato e MOPS.

Em 1998 Lozano-Chiu e colaboradores empregando metodologia proposta no documento M27-A (CLSI, 1997) e E-test<sup>®</sup> em três meios de cultura diferentes detectaram resistência à anfotericina B em *C. neoformans*.

Moraes, Prímola e Hamdan (2002) estudaram 64 amostras clínicas e ambientais de *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii* e avaliaram o perfil de sensibilidade frente à anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol e itraconazol através da metodologia padrão CLSI (M27-A, 1997) e macrodiluição descrita por Shadomy; Espinel-Ingroff; Cartwright (1987) *apud* Moraes, Prímola e Hamdan (2002). De acordo com os resultados para a maioria das drogas houve diferença significativa entre as leituras de 24 e 48 h e entre as CIMs do fluconazol e anfotericina B nas duas metodologias. Nenhuma diferença significativa quanto ao perfil de sensibilidade foi observada em relação à origem dos fungos, com exceção à variedade *C. neoformans* var. *gattii* que apresentou CIMs elevadas para anfotericina B na macrodiluição.

No trabalho Bedout e colaboradores (1999) temos exemplos de casos de amostras de *C. neoformans* que também apresentaram resistência *in vitro* à anfotericina B; Rodero e colaboradores (2000) avaliaram a sensibilidade de amostras resistentes *in vivo* a anfotericina B que *in vitro* apresentaram mesmo perfil de sensibilidade. Uma explicação para tais casos pode estar no fato da melanina poder se ligar a drogas antifúngicas como a anfotericina B e a caspofungina, que são eficazes em células melanizadas, porém observa-se dificuldade na

erradicação da levedura e até mesmo falência do tratamento quando melanizadas (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2006).

Uma amostra resistente a anfotericina B foi isolada na clínica durante o tratamento de um caso de meningite recorrente por *C. neoformans*, e esta apresentava um “defeito” na enzima esterol delta 8→7 isomerase, porém não houve alteração na sensibilidade às drogas azólicas neste caso. Contudo existem relatos de mutações envolvendo a enzima 5,6 desaturase da rota biosintética dos esteróis que é comum aos polínicos e aos azóis, conferindo assim resistência cruzada aos patógeno (KELLY et al., 1994; PERFECT; COX, 1999).

Ainda com relação à resistência cruzada, um trabalho realizado por Joseph e colaboradores (1995), relata a ocorrência desta entre drogas poliênicas e azólicas, a qual não está relacionada com a alteração da rota de biossíntese de esteróides, mas sim com a redução da quantidade de antifúngico dentro da célula que, por mutação, passa a bloquear a entrada ou então bombeia as drogas para fora das células através de um sistema de bomba de efluxo.

A resistência a drogas antifúngicas é um problema complexo quando se trata de infecções causadas pelo *C. neoformans*, uma vez que esta é influenciada por vários fatores, tais como tipo de infecção apresentada pelo paciente, complicações secundárias (p.ex.: hidrocefalia), intolerância à droga e pouca adesão ao tratamento e o surgimento de amostras resistentes às drogas utilizadas na terapêutica (PERFECT; COX, 1999).

As principais drogas disponíveis atualmente para terapêutica das infecções fúngicas pulmonares e sistêmicas são anfotericina B (desoxicolato de sódio, lipossomal, dispersão coloidal, complexo lipídico), drogas azólicas (miconazol, cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e ravuconazol) e equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina) (MARTINEZ, 2006).

Larsen e colaboradores (2004) realizaram estudos para avaliação dos efeitos isolados e sob combinação das drogas mais utilizadas na terapêutica da meningite criptocócica (5-fluorocitosina, fluconazol e anfotericina B) e verificaram melhor desempenho da associação fluconazol-anfotericina B.

A combinação é uma estratégia atraente, pois pode reduzir a dose de anfotericina B, o uso combinado reduz o desenvolvimento de resistência à 5-fluorocitosina, têm sido observado por pesquisadores negatividade das leveduras no líquido cérebro-espinhal com duas semanas de terapia combinada e resulta em menor mortalidade quando utiliza-se apenas anfotericina B (JOHNSON; PERFECT, 2007). Por estes motivos a terapia combinada têm sido a primeira escolha para a meningite criptocócica (SAAG et al., 2000). Brouwer e colaboradores (2004) em estudo quantitativo do número de leveduras no líquido cérebro-espinhal mostrou que a

combinação anfotericina B com 5-fluorocitosina teve melhor atividade fungicida que a anfotericina B sozinha, associada ao fluconazol ou a combinação das três drogas.

No tratamento da criptococose pulmonar em imunocompetentes utiliza-se como terapia primária a anfotericina B e como terapia alternativa o fluconazol. Na criptococose disseminada e meningocócica em imunodeprimidos, adota-se anfotericina B associada a 5-fluorocitosina por duas semanas e fluconazol até término do tratamento e, como alternativa, uma dose inicial elevada de anfotericina B seguida de fluconazol (MARTINEZ, 2006). O tratamento recomendado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2008) e Saag e colaboradores (1992) para pacientes imunocompetentes e com AIDS portadores de criptococose é anfotericina B na fase aguda e fluconazol na fase de manutenção ou profilática.

Os mecanismos de ação sobre as células fúngicas das duas principais drogas utilizadas na terapêutica são: a anfotericina B atua como fungicida, pois liga-se ao ergosterol presente na membrana de fungos, modificando a permeabilidade conduzindo à perda dos componentes citoplasmáticos (MARTINEZ, 2006), além disso no trabalho de Zaragoza e colaboradores (2005) sugeriu-se um mecanismo adicional de ação, redução do tamanho da cápsula (alteração da morfologia celular) e da quantidade de GMX liberada para o soro favorecendo a resposta imune do hospedeiro. O fluconazol, representante das drogas azólicas, é fungistático, e atua sobre enzimas do citocromo P450, principalmente a 14- $\alpha$ -demetilase, impedindo a síntese de ergosterol, alterando a permeabilidade da membrana e a viabilidade fúngica; age também modificando a síntese de lipídeos e inativando enzimas do processo oxidativo (MARTINEZ, 2006).

Os testes de sensibilidade *in vitro* têm como objetivo permitir prognosticar a dose mínima necessária para efeito clínico, porém essa correlação nem sempre é possível. Contudo o trabalho de Larsen e colaboradores (2005) através da macrodiluição (CLSI, M27-A2, 2002) modificada para permitir a contagem das células viáveis, utilizando fluconazol em diferentes concentrações por análises de regressão procurou estabelecer relação entre os testes *in vitro* e a resposta *in vivo*; os resultados obtidos mostraram forte correlação entre os testes laboratoriais e os testes realizados em camundongos.

Novas drogas têm sido introduzidas no tratamento da criptococose como os azóis: Voriconazol (terceira geração) que apresenta amplo espectro e é ativo contra as amostras resistentes aos azóis de primeira geração (Cetoconazol, bifonazol, clotrimazol e miconazol) e inibe a melanização em *C. neoformans* (JOHNSON; KAUFFMAN, 2003; PURKINS et al., 2003; VAN DUIN et al., 2004; HOF, 2006; MARTINEZ et al., 2007).

O novo azólico de terceira geração, posaconazol, está em fase de estudos *in vitro* para avaliação contra fungos filamentosos e leveduras, apresentando excelente atividade contra *C. neoformans* (HOF, 2006; GREER, 2007). Em fase de estudos pré-clínicos (Fase 3) no tratamento de infecções fúngicas estão quatro agentes: isavuconazol, ravuconazol, albaconazol e aminocandina; o isavuconazol e ravuconazol apresentam amplo espectro de atividade e boa eficácia *in vitro* contra *Aspergilose* e *Candidiase*; o albaconazol têm apresentado potente atividade contra espécies de *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus*; a aminocandina e equinocandina de uso intravenoso apresentam atividade *in vitro* contra *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. (PASQUALOTTO; DENNING, 2008).

Estudos sobre a fisiologia e bioquímica de *C. neoformans* são de importância, pois podem revelar novos alvos para novas drogas antifúngicas originando alternativas que eliminariam ou atenuariam os problemas enfrentados de elevada toxicidade na atual terapêutica da criptococose. Como possíveis alvos para novos fármacos, enzimas essenciais para a viabilidade e envolvidas na patogênese em *C. neoformans* têm sido descritas, tais como a topoisomerase I (Del POETA et al. 1999), a enzima transportadora de membrana H<sup>+</sup>ATPase (SOTEROPOULUS et al., 2000), as fosfolipases (GANENDREN et al., 2004), a glicosilceramida (RITTERSHAUS et al., 2006), a ácido graxo sintase (CHAYAKULKEEREE et al., 2007) e a homoserina transacetilase (NAZI et al., 2007).

Na busca de novas alternativas para o tratamento das infecções causadas por *C. neoformans*, existem estudos realizados com fitoterápicos que buscam efeitos fungistáticos ou até mesmo fungicidas, sendo este último obtido nos estudos de Passos e colaboradores (2002) estudando a *Caryocar brasiliensis* (*Caryocaraceae*), popular pequizeiro, eles observaram atividade antifúngica no extrato alcoólico da cera componente da cutícula da folha, e ainda constataram diferença na atividade do extrato quanto à época de coleta no ano, sendo a atividade do extrato maior quanto menor o índice pluviométrico, a atividade antifúngica também já foi constatada no óleo essencial das sementes desta planta. Lima e colaboradores (2005) avaliaram o perfil de sensibilidade de leveduras (*Candida albicans* ATCC 76615, *C. tropicalis* MD-40, *C. parapsilosis* ME-02, *C. stellatoidea* LM-41V, *C. guilliermondii* LM-67, *C. krusei* FCF-281 and *Cryptococcus neoformans* JSS-07) causadoras potenciais de infecções oportunistas, frente aos fitoconstituintes:  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, citral e eugenol e comprovou o efeito fungicida dos mesmos.

Cruz e colaboradores (2007) investigaram quatro plantas medicinais de uso popular no tratamento de micoses (*Ziziphus joazeiro*, *Caesalpinia pyramidalis*, *Bumelia sartorum* e *Hymenaea courbaril*), e somente os extratos aquosos de *Ziziphus joazeiro* e *Caesalpinia*

*pyramidalis* apresentaram significante atividade antifúngica contra *C. neoformans* (CIM 12,5 a 100 µg/mL) utilizando como padrão anfotericina B, comprovando, assim, o efeito destas plantas que são candidatas para desenvolvimento de novos antifúngicos.

Braga e colaboradores (2007) estudaram as atividades antimicrobianas dos extratos metanólicos de vinte plantas de uso popular contra *Leishmania*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*; dentre elas as melhores atividades contra *C. neoformans* foram encontradas em *Bixa orellana* (Urucum), *Ocimum gratissimum* (Alfavacão) e *Syzygium cumini* (Jambolão) com CIM de 78,0 µg/mL.

E ainda na procura de novos agentes antifúngicos estão em estudo diferentes ácidos graxos, alguns originados de esponjas marinhas, que agem por inibição enzimática principalmente sobre a *N*-Myristoiltransferase impedindo o crescimento e interferindo no metabolismo lipídico fúngico (CARBALLEIRA, 2008).

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 AMOSTRAS DE *Cryptococcus neoformans*, TESTES E CONTROLES

Nos testes de avaliação da produção de melanina em *C. neoformans*, o teste de avaliação da produção de melanina em meio sólido sob diferentes condições de cultivo foi realizado com 10 amostras de *C. neoformans*, sendo 5 de origem clínica e 5 de origem ambiental, mantidas na micoteca do laboratório de micologia do ICB/USP. Como controle foi utilizado o padrão de *C. neoformans* ATCC 90112 e placas sem inóculo como controle de esterilidade.

Para os testes empregando a eletroforese em gel PAGE não-desnaturante foram utilizadas 30 amostras de *C. neoformans* para melhor avaliar a metodologia, sendo 15 de origem clínica e 15 de origem ambiental, mantidas na micoteca do laboratório de micologia do ICB/USP. Como controles foram utilizados a amostra padrão de *C. neoformans* ATCC 90112 e foi aplicado no gel a Lacase de *Rhus vernificera* padrão Sigma<sup>®</sup>.

Nos testes de sensibilidade aos antifúngicos com e sem adição de melanina foram utilizadas as mesmas amostras do teste de avaliação da produção de melanina em meio sólido sob diferentes condições de cultivo.

Os antifúngicos utilizados foram a Anfotericina B e o Fluconazol. As metodologias empregadas na determinação da sensibilidade aos antifúngicos foram: difusão em agar a partir de disco (CECON<sup>®</sup>, Brasil) conforme documento M44-A (CLSI, 2004) e difusão em agar a partir de fita (E-test<sup>®</sup> - AB BIODISK, Solna, Sweden). Como controles foram utilizados os padrões de *C. neoformans* ATCC 90112, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258. E placas sem inóculo como controle de esterilidade.

Todos os testes foram realizados em duplicata.

## 5. 2 PRODUÇÃO DE MELANINA EM MEIO SÓLIDO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para avaliar a produção de melanina das amostras estudadas foram realizadas as seguintes variações nas condições de cultivo:

Os meios sólidos com L-dopa foram preparados com três pH diferentes (5,0, 6,0 e 7,0), ajustados com solução de NaOH (1,0 M) e após inoculação incubados nas temperaturas de 25°C, 30°C e 35°C.

Como controle foi utilizado o padrão de *C. neoformans* ATCC 90112.

### 5.2.1 Meio com L-dopa

Este meio é composto por duas soluções (A e B), preparadas conforme Baroni (2001) (ANEXO A).

### 5.2.2 Preparo dos inóculos

As suspensões das amostras e do padrão de *C. neoformans* ATCC 90112 foram preparadas com valor de absorbância correspondente à da escala 1,0 de McFarland, entre 0,24-0,26 a 530 nm, em seguida, contou-se em câmara de Neubauer o número de células por mL e padronizou-se a quantidade aplicada nas placas em  $1,5 \times 10^5$  células.

### 5.2.3 Procedimentos

As placas preparadas foram divididas em 4 (quatro) partes iguais, sendo que em cada quadrante foi aplicado o volume correspondente a  $1,5 \times 10^5$  células.

Incubou-se as placas nas três temperaturas definidas (25°C, 30°C e 35°C).

O crescimento das amostras foi observado diariamente por um período de 5 a 8 dias para avaliar a produção de melanina.

O controle positivo foi realizado incubando as amostras nas mesmas condições, porém sem adição de substrato (L-dopa) e o controle negativo incubando placa contendo meio com L-dopa sem inóculo.

### 5.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MELANINA POR MEIO DA ELETROFORESE EM GEL PAGE NÃO-DESNATURANTE

#### 5.3.1 Amostras, meios de cultura e inóculos

Trinta amostras de *C. neoformans*, sendo 15 (quinze) de origem clínica e 15 (quinze) de origem ambiental foram utilizadas.

As amostras foram inicialmente cultivadas em agar Sabouraud suplementado com 2,0% de extrato de levedura por 48 h a 30 °C, em seguida foram transferidas para 3 (três) Erlenmeyers com 50 mL de caldo Sabouraud suplementado com 2,0 % de extrato de levedura e incubadas por 48 h a 30 °C e sob agitação de 150 rpm.

#### 5.3.2 Montagem do gel de poliacrilamida não-desnaturante

O gel PAGE não-desnaturante é composto de duas partes - gel de corrida a 7,0 % e de empilhamento a 4,0 % (ANEXO B).

Após montagem o gel foi mantido mergulhado em tampão de eletrodo (Anexo C) em refrigerador até término da extração das amostras.

### 5.3.3 Etapa de pré-extração das células

A etapa de preparo das células na pré-extração foi baseada no trabalho de Wang; Aisen; Casadevall (1995) porém, com modificações.

Após crescimento as amostras foram transferidas para tubos Falcon de 50 mL, centrifugadas à 4.000 rpm (Centrífuga Eppendorf 5810 R) a  $\pm 25$  °C até sedimentação das células. O sobrenadante, após esterilização, foi descartado.

As células de cada amostra foram reunidas em um único tubo Falcon, ressuspensas em 50 mL de água destilada (1ª Lavagem), centrifugadas nas condições já descritas, e em seguida resuspensas em aproximadamente 5,0 mL de tampão de extração (50 mM fosfato de sódio monobásico e 0,5 M de cloreto de sódio, pH 6,3) – (2ª Lavagem).

Centrifugou-se nas mesmas condições, descartou-se o sobrenadante, e resuspendeu-se as células em 1,0 mL de tampão de extração. Adicionou-se o inibidor de protease PMSF (solução alcoólica a 10 %) na quantidade de 150 µL/mL e 3,0 mL de pérolas de vidro de 2,0 mm de diâmetro (Glass beads Sigma®) para cada 5,0 mL de suspensão de célula;

Resfriou-se a suspensão celular, a 0 °C por 15 min., antes de iniciar o rompimento no ultra-som.

### 5.3.4 Extração das amostras de *C. neoformans* com ultra-som

As células de *C. neoformans* mantidas em tubos Falcon e resfriadas em banho de gelo foram submetidas ao tratamento com ultra-som (Sonics Vibra Cell) nos seguintes parâmetros: amplitude de 40 % por 5 min. com pulso ligado por 9,0 segundos e pulso desligado 0,2 segundos.

A suspensão do extrato celular foi centrifugada a 4.000 rpm a 0 °C por 15 min. Em seguida, o extrato celular foi mantido em banho de gelo, em caixa térmica e no refrigerador até o fim do teste; e uma alíquota do sobrenadante do extrato celular foi submetida à quantificação da proteína total.

### 5.3.5 Quantificação da proteína total

A quantificação da proteína total do extrato celular de *C. neoformans* foi realizada pelo método de Bradford (1976). Para quantificação o reagente de Bradford foi preparado e calibrado conforme Alexander; Griffiths (1993) sendo as absorvâncias lidas a 595 nm. A equação da reta com seus parâmetros (intercessão com eixo y, inclinação da reta e correlação linear) foram calculados pelo programa Excel da Microsoft (Gráfico 5.1).

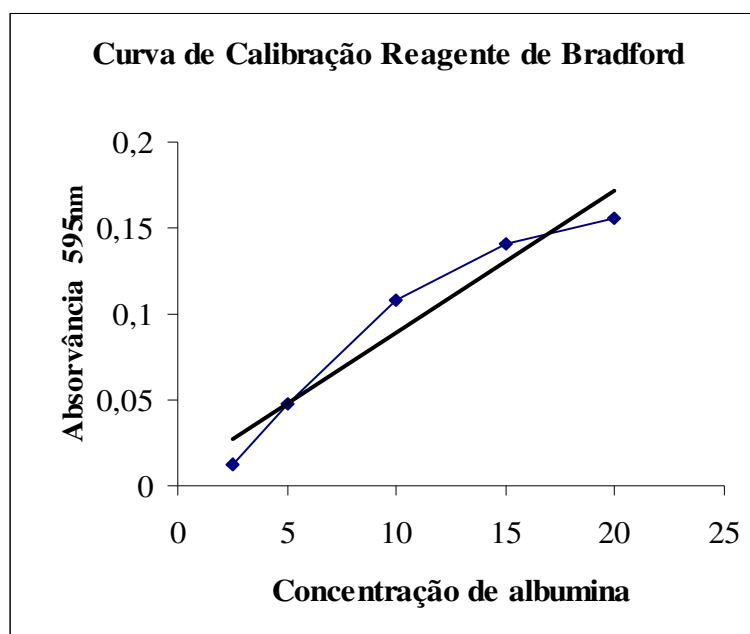


Gráfico 5.1 – Curva de Calibração do Reagente de Bradford

Intercessão com eixo y (b) = 0,006143

y = absorvância a 595 nm

Inclinação da reta (a) = 0,008272

x = concentração de proteína

Correlação linear (r) = 0,9682

A equação é do tipo:  $y = ax + b \rightarrow y = 0,008272 x + 0,006143$

As absorvâncias a 595 nm contida em 50  $\mu$ L de proteína total do extrato celular de *C. neoformans* estão no Apêndice A.

#### 5.3.5.1 Cálculo da proteína total e padronização da quantidade aplicada no gel

Após cálculo da concentração de proteína total no extrato celular, a quantidade a ser aplicada no gel foi calculada de acordo com a capacidade do poço no gel e o volume de tampão de amostra (Anexo H) a ser misturado antes da aplicação.

O espaçador utilizado para determinar a espessura do gel foi de 1,5 mm gerando poços com volume médio (VM) de amostra de 120  $\mu\text{L}$ .

A amostra aplicada no gel era composta de extrato celular de *C. neoformans* e tampão de amostra seguindo aproximadamente a proporção de 2:1 (2 volumes de extrato celular: 1 tampão de amostra). Como o volume médio do poço foi de 120  $\mu\text{L}$  o volume de tampão de amostra foi padronizado para 35  $\mu\text{L}$  e de extrato celular para 85  $\mu\text{L}$ .

A quantidade de proteína total foi padronizada para permitir comparação da quantidade de lacase produzida entre diferentes amostras. O valor foi definido pela menor quantidade de proteína total obtida dentre as primeiras amostras ensaiadas e de acordo com o volume para o extrato celular sendo calculado com base na amostra que apresentou o menor teor protéico.

A amostras ICB 95 apresentou a menor quantidade de proteína total (12,5  $\mu\text{g}$  em 50 $\mu\text{L}$ ), portanto em 85  $\mu\text{L}$  a quantidade de proteína total aplicada no gel foi de aproximadamente 21,3  $\mu\text{g}$ , a partir desta quantidade de proteína padrão as demais amostras tiveram o volume do extrato celular calculado.

Os volumes de tampão de amostra, extrato celular das amostras de *C. neoformans* e o volume total aplicado nos géis estão na tabela a seguir.

Tabela 5.1 - Volumes de tampão de amostra, extrato celular e total aplicado no gel para as amostras de *C. neoformans* (clínicas, ambientais e ATCC 90112).

	Amostra	Volume de tampão de amostra (μL)	Volume extrato celular (μL)	Vol. total aplicado (μL)
C	ICB 81	35	39,0	74,0
	ICB 154	35	42,0	77,0
L	VPBet	35	38,0	73,0
	ICB 95	35	49,0	84,0
I	HNR 41	35	44,0	79,0
	RO1	35	48,0	83,0
N	HNR 39	35	22,0	57,0
	ICB 155	35	53,0	88,0
C	CN 103	35	50,0	85,0
	ICB 23	35	60,0	95,0
A	ICB 169	35	57,0	92,0
	ICB 89 RN	35	62,0	97,0
S	ICB 189	35	61,0	96,0
	ICB 88	35	67,0	102,0
	RO2	35	68,0	103,0
A	Sul amb 3	35	107,0	142,0
	B 60	35	92,0	127,0
M	Sul amb 1	35	104,0	139,0
	ICB 184	35	47,0	82,0
B	B 52	35	82,0	117,0
	B 51	35	51,0	86,0
E	B 79	35	68,0	103,0
	BO 5	35	38,0	73,0
N	BO 2	35	71,0	106,0
	ICB 187	35	79,0	114,0
T	ICB 178	35	50,0	85,0
	C 7	35	53,0	88,0
A	C 18	35	48,0	83,0
	B 78	35	51,0	86,0
S	B 96	35	51,0	86,0

### 5.3.6 Preparo das amostras e do padrão de lacase para aplicação no gel

Transferiu-se 35 μL de tampão de amostra para tubos Eppendorfs de 1 mL, adicionaram-se os volumes calculados do extrato celular para cada amostra e manteve-se em banho de gelo até o momento da aplicação no gel.

A solução do padrão de Lacase (*Rhus vernificera* Sigma®) foi preparada dissolvendo-se 4,0 mg da enzima em 100 μL de tampão fosfato de potássio monobásico pH 6,0 (conforme

protocolo do fabricante) e desta 85  $\mu\text{L}$  foram misturados a 35  $\mu\text{L}$  do tampão de amostra e aplicados no gel, sendo a concentração aplicada de 2,8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

### 5.3.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante

Em cada gel foram aplicadas 5 (cinco) amostras de *C. neoformans*.

A fonte foi programada para voltagem inicial de 60 V enquanto percorreu o gel de empilhamento, em seguida aumentou-se para 90 V e acompanhou-se a corrida das amostras até o fim do gel. O tempo total médio de corrida do extrato celular das amostras no gel foi de 3 h.

Após término da corrida, mergulhou-se o gel em 50 mL de tampão de revelação (0,1 M ácido cítrico: 0,2 M fosfato de sódio bibásico, pH 6,0) com 2,0 mM de L- dopa por 6 h à temperatura ambiente.

### 5.3.8 Quantificação do pigmento

A quantificação foi realizada em densitômetro conforme os seguintes procedimentos:

Após revelação das bandas, o gel foi fotografado com a máquina Kodak DC 290, as imagens transferidas para o computador e a análise densitométrica realizada no programa Kodak 1D 3.5.4 (Resolução 720 X 480 pixels, cores - 24 bit e ASA/ISO “sensitivity” de 100).

O formato das bandas nos géis (região de interesse – RI) foi padronizado para a forma retangular, sendo todas de mesmo tamanho. Como controle foi selecionada uma região do gel sem mancha de mesma área.

As intensidades das bandas no gel foram calculadas abrindo-se no programa a janela de análise de dados, em seguida clicando-se em “show”, “RI” e “RI analysis data”;

Após avaliação da melanização das amostras de *C. neoformans* em meio sólido e por meio da eletroforese em gel não-desnaturante, estas foram cultivadas em meio com L-dopa para obtenção das partículas de melanina que foram incorporadas nos testes de sensibilidade aos antifúngicos fluconazol e anfotericina B descritos a seguir.

#### 5.4 SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

Os testes de sensibilidade aos antifúngicos foram realizados com e sem adição de melanina, para tal, inicialmente induziu-se a melanização das amostras de *C. neoformans* e do padrão de *C. neoformans* ATCC 90112, seguido da extração para obtenção das partículas de melanina.

Para avaliação da sensibilidade das amostras aos antifúngicos foram utilizadas as metodologias de difusão em agar a partir de disco (M44 A, CLSI, 2004) e difusão em agar a partir de fita (E-test<sup>®</sup>).

Os discos dos antifúngicos fluconazol e anfotericina B utilizados foram da marca CECON<sup>®</sup>. As concentrações dos discos eram de 25 µg para o fluconazol e 100 µg para a anfotericina B. Os discos foram estocados a -20 °C até utilização.

As fitas E-test<sup>®</sup> dos antifúngicos apresentam gradientes de concentração para anfotericina B que variam em uma escala de 0,002 µg/mL a 32,0 µg/mL e para o fluconazol, de 0,016 µg/mL a 256,0 µg/mL. As fitas foram estocadas a -20 °C até o momento do uso.

Como controles de qualidade nos testes de sensibilidade aos antifúngicos foram utilizadas as amostras padrões de *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258. Para os testes de sensibilidade aos antifúngicos com adição de melanina e na etapa de obtenção das partículas de melanina, apenas o padrão de *C. neoformans* ATCC 90112 foi cultivado na presença de L-dopa. Placas sem inóculo foram incubadas como controle de esterilidade do meio de cultura.

O controle de esterilidade das suspensões de partículas de melanina foi realizado por inoculação de alíquotas em caldo BHI, com incubação a 30 °C por 3 (três) dias, imediatamente após a tindalização parcial e depois de 48 h. Como controle positivo o caldo BHI foi inoculado com alíquotas antes da tindalização e caldo BHI sem inóculo foi o controle negativo.

Os testes de sensibilidade aos antifúngicos com e sem adição das partículas de melanina foram executados simultaneamente.

As partículas de melanina das amostras de *C. neoformans* utilizadas nos teste de sensibilidade aos antifúngicos foram obtidas como descrito a seguir.

### 5.4.1 Obtenção das partículas de melanina

#### 5.4.1.1 Preparo do inóculo

As amostras de *C. neoformans* e o padrão ATCC 90112 utilizados foram inoculados em agar Sabouraud e incubados por 48 h a 30 °C.

#### 5.4.1.2 Procedimentos para melanização de *C. neoformans*

Após crescimento, as células foram transferidas para meio de cultura líquido descrito por Silva, Melo e Oliveira (2004) com as seguintes modificações, retirou-se o farelo de trigo e introduziu-se L-dopa (1,0 mM) (ANEXO J). As células foram incubadas a 30 °C por 21 dias sob agitação de 150 rpm e protegidas da luz para indução da melanização.

As células não melanizadas foram obtidas em meio sem L-dopa.

Para o meio sem L-dopa após ajuste do pH o volume de água foi completado até o total, procedeu-se a esterilização e distribuição nos Erlenmeyers que também foram mantidos ao abrigo da luz.

#### 5.4.1.3 Procedimentos da extração para obtenção das partículas de melanina

A extração para obtenção das partículas de melanina foi realizada segundo Rosas (2000) com algumas modificações. Após incubação por 21 dias a 30 °C e sob agitação de 150 rpm as células melanizadas e não-melanizadas foram tratadas para obtenção das partículas de melanina da seguinte forma:

a) Em tubos Falcon as culturas foram centrifugadas por 30 min. a 3.000 rpm, o sobrenadante foi esterilizado e descartado;

b) As células foram lavadas em 3 mL de tampão PBS pH 7,2 (Anexo I), centrifugadas (nas condições do item a) e ressuspensas em 1 mL de tampão citrato de sódio (0,1 M) e sorbitol (1,0 M) pH 5,5;

c) Adicionou-se 10 mg da enzima para lise da parede celular extraída de *Trichoderma harzianum* (Sigma®), incubou-se a 30 °C por 12 h. Em seguida centrifugou-se nas condições do item a, descartou-se o sobrenadante e lavou-se o sedimento com 3 mL de tampão PBS pH 7,2;

d) Centrifugou-se nas condições do item a, descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 1 mL da solução de tiocinato de guanidina 4,0 M e incubou-se por 12 h;

e) Centrifugou-se o tubo com o sedimento a 3.500 rpm por 30 min., descartou-se o sobrenadante, lavou-se o sedimento com 3 mL de tampão PBS pH 7,2, procedeu-se outra centrifugação nas condições já descritas e descartou-se o sobrenadante;

f) Ressuspendeu-se o sedimento em solução de proteinase K (1,0 mg/mL) em tampão Tris 10 mM e CaCl<sub>2</sub> 1,0 mM e incubou-se por 2 h a 30 °C, centrifugou-se nas condições do item e, descartou-se o sobrenadante e lavou-se com 3 mL de tampão PBS pH 7,2;

g) Procedeu-se a extração com clorofórmio por 3 (três) vezes, sendo utilizado 2 mL em cada etapa. Entre as etapas de extração a fase clorofórmica foi desprezada e após a terceira etapa lavou-se o sedimento com 3 mL de tampão PBS pH 7,2, centrifugou-se a suspensão nas condições do item e, e descartou-se o sobrenadante;

h) O sedimento foi submetido à ebulição em HCl 6,0 M por 1 h, centrifugou-se a suspensão nas condições do item e, descartou-se o sobrenadante e lavou-se em 3 mL de tampão PBS pH 7,2;

i) As partículas de melanina foram transferidas para membrana para diálise (Spectrapor® Membrane n°1) e procedeu-se a diálise em água destilada por 10 dias sob refrigeração com troca diária da água;

#### 5.4.1.4 Tindalização parcial

As partículas de melanina das amostras de *C. neoformans* e do padrão ATCC 90112 foram transferidas para tubos de ensaio e submetidas a 1 ciclo de aquecimento no vapor d'água por 1 hora em autoclave.

Transferiu-se alíquotas de 50 µL das suspensões de melanina para 3 mL de Caldo BHI imediatamente depois da tindalização parcial e após 48 h; incubou-se por 3 (três) dias a 30°C.

Controles: Caldo BHI inoculado com 50 µL de suspensão de melanina antes da tindalização parcial (controle positivo) e caldo BHI sem inóculo (controle negativo).

#### 5.4.1.5 Padronização da quantidade das partículas de melanina

As partículas de melanina foram contadas em câmara de Neubauer para quantificação e padronização das suspensões em aproximadamente  $10^8$  partículas de melanina por mL.

As suspensões padronizadas das partículas de melanina foram utilizadas nos testes de sensibilidade aos antifúngicos.

#### **5.4.2 Preparo do meio de cultura agar Mueller-Hinton suplementado com 2 % de glicose e 0,5 µg/mL de azul de metileno para os testes de sensibilidade aos antifúngicos com e sem adição de melanina**

O meio foi preparado conforme Pfaller e colaboradores (2005a) dissolvendo-se o ágar Mueller-Hinton suplementado e a glicose em água destilada, em seguida adicionou-se o azul de metileno e verteu-se 25 mL de meio em frascos de vidro de 50 mL.

Esterilizou-se o meio de cultura em autoclave por 15 min. a 121°C e verteu-se em placas de Petri (90 mm de diâmetro) com espessura média de 4,0 mm.

#### **5.4.3 Método de difusão em agar a partir de disco**

O teste foi realizado segundo o documento M44-A (CLSI, 2004).

#### 5.4.3.1 Preparo do inóculo

As amostras e os padrões de *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258 foram cultivadas inicialmente em agar Sabouraud por 48 h a 30 °C.

Em seguida os padrões de *Candida* spp. foram cultivados por 24 h a 35 °C conforme o documento M44 A (CLSI, 2004); as amostras de *C. neoformans* e o padrão ATCC 90112 por 48 h a 30 °C em agar Sabouraud.

Preparou-se suspensões com 3 a 5 colônias das leveduras em 5 mL de solução de NaCl 0,85 % e ajustou-se turbidez por comparação de modo a ter o mesmo valor de absorbância correspondente à da escala 0,5 de McFarland no espectrofotômetro a 530 nm.

#### 5.4.3.2 Procedimentos de inoculação do meio agar Müller-Hinton suplementado

A superfície do agar foi inoculada com a suspensão de *C. neoformans*, utilizando um “swab” estéril, aguardou-se a superfície do meio secar por 10 min., em seguida os discos dos antifúngicos que estavam reservados por 15 a 20 min. para atingir a temperatura ambiente foram depositados na superfície do meio e levemente pressionados sobre o agar, sendo mantida uma distância de 1,5 a 2,0 cm entre os discos e 1,0 cm da borda da placa.

#### 5.4.3.3 Condições de incubação e leitura das placas do teste de difusão em agar a partir de disco

Após semeadura, as placas foram invertidas e incubadas a 30 °C por 72 h, sendo observado o crescimento das colônias e realizada a leitura das placas a cada 24 h.

As leituras das placas com os padrões de *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 foram realizadas conforme documento M44 A (CLSI, 2004).

#### **5.4.4 Método de difusão em agar a partir de disco em meio melanizado**

O teste foi realizado segundo o documento M44-A (CLSI, 2004) adicionando na superfície do meio de cultura quantidade padronizada de partículas de melanina.

##### **5.4.4.1 Preparo do inóculo e do meio agar Mueller-Hinton suplementado – difusão em agar a partir de disco em meio melanizado**

O preparo do inóculo das amostras de *C. neoformans*, do padrão ATCC 90112 e do meio agar Mueller-Hinton suplementado foi realizado conforme a descrito nos itens 5.4.3.1 e 5.4.2 respectivamente.

##### **5.4.4.2 Procedimentos de inoculação do meio agar Mueller-Hinton suplementado – difusão em agar a partir de disco em meio melanizado**

A superfície do agar foi inoculada com a suspensão de *C. neoformans*, utilizando um “swab” estéril, aguardou-se a superfície do meio secar por 10 min.

Em seguida aplicou-se na superfície da placa 0,5 mL das suspensões de partículas de melanina com concentração de aproximadamente  $10^8$  partículas/mL que foi distribuído de tal forma a cobri-la uniformemente.

Após 15 min., para secagem das placas, os discos dos antifúngicos foram depositados na superfície do meio.

#### 5.4.4.3 Condições de incubação e leitura das placas do teste de difusão em agar a partir de disco em meio melanizado

As placas com as amostras de *C. neoformans* e o padrão ATCC 90112 foram invertidas e incubadas a 30 °C por 72 h, sendo observado o crescimento das colônias e realizada a leitura das placas a cada 24 h.

#### 5.4.5 Método de difusão em agar a partir de fita (E-test<sup>®</sup>)

O teste foi realizado conforme o fabricante AB BIODISK utilizando como meio de cultura agar Mueller-Hinton suplementado.

##### 5.4.5.1 Preparo do inóculo e do meio agar Mueller-Hinton suplementado – difusão em agar a partir de fita (E-test<sup>®</sup>)

O preparo do inóculo das amostras e do padrão ATCC 90112 de *C. neoformans*, dos padrões *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258 e do meio agar Mueller-Hinton suplementado foi realizado conforme a descrito nos itens 5.4.3.1 e 5.4.2 respectivamente.

##### 5.4.5.2 Procedimentos de inoculação do meio agar Mueller-Hinton suplementado – difusão em agar a partir de fita (E-test<sup>®</sup>)

A superfície do agar foi inoculada com a suspensão das amostras de *C. neoformans* e com os padrões ATCC de *Candida* e *Cryptococcus*, utilizando um “swab” estéril, embebido na suspensão celular das amostras com turbidez equivalente a escala 0,5 de McFarland.

Após 10 min., com a superfície do agar seca, uma fita de cada antifúngico foi aplicada na placa em posições antiparalelas.

#### 5.4.5.3 Condições de incubação e leitura das placas do teste de difusão em agar a partir de fita (E-test®)

As placas com as amostras de *C. neoformans* foram invertidas e incubadas à temperatura de 30 °C por 72 h, sendo observado o crescimento das colônias e realizada a leitura das placas a cada 24 h.

As placas com os padrões ATCC de *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 foram incubadas à temperatura de 35 °C por 72 h, sendo avaliadas quanto ao crescimento das amostras após 24 h, 48 h e 72 h.

#### 5.4.6 Método de difusão em agar a partir de fita (E-test®) em meio melanizado

O teste foi realizado conforme o fabricante AB BIODISK utilizando como meio de cultura agar Mueller-Hinton suplementado e adicionando à superfície do meio de cultura quantidade padronizada de partículas de melanina.

##### 5.4.6.1 Preparo do inóculo e do meio agar Mueller-Hinton suplementado – difusão em agar a partir de fita (E-test®) em meio melanizado

O preparo do inóculo das amostras e do padrão ATCC 90112 de *C. neoformans*; e meio agar Mueller-Hinton suplementado foram realizados conforme a descrito nos itens 5.4.3.1 e 5.4.2 respectivamente.

##### 5.4.6.2 Procedimentos de inoculação do meio agar Mueller-Hinton suplementado – difusão em agar a partir de fita (E-test®) em meio melanizado

A superfície das placas foram inoculadas com a suspensão das amostras de *C. neoformans* e com o padrão ATCC 90112, utilizando um “swab” estéril, embebido na suspensão celular das amostras com turbidez equivalente a escala 0,5 de McFarland.

Após 10 min., com a superfície do agar seca, foi aplicado e distribuído homogeneamente 0,5 mL da suspensão das partículas de melanina na concentração de aproximadamente  $10^8$  partículas/mL de tal forma a cobri-la uniformemente.

Em seguida após 10 min. com a superfície seca novamente, uma fita de cada antifúngico foi aplicada na placa em posições antiparalelas.

#### 5.4.6.3 Condições de incubação e leitura das placas

As placas com as amostras de *C. neoformans* e o padrão ATCC 90112 foram invertidas e incubadas à temperatura de 30 °C por 72 h, sendo observado o crescimento das colônias e realizada a leitura das placas a cada 24 h.

### 5.5 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os critérios empregados para avaliação dos resultados dos testes realizados encontram-se a seguir.

#### 5.5.1 Produção de melanina em meio sólido sob diferentes condições de cultivo

A melanização das amostras de *C. neoformans* em meio de cultura sólido com L-dopa foi acompanhada diariamente e analisada a olho nu, sendo o início do processo observado no terceiro dia de incubação com células levemente melanizadas, chegando à melanização máxima no oitavo dia, conforme trabalho de Rosas e Casadevall (2000).

À melanina produzida pelas amostras de *C. neoformans* sob diferentes condições de cultivo atribuiu-se valores variando entre 1 a 5, sendo ao bege (1), marrom claro (2), marrom (3), marrom escuro (4), preto (5).

Para avaliação das amostras estudadas adotou-se o esquema de escala de cores com valores de 1 a 5, conforme proposto por Baroni (2001) com alteração nos valores 1 e 2 da escala que foram relacionadas às cores bege e marrom clara, respectivamente. A redução na pigmentação foi atribuída a valores inferiores a 3 que correspondem às cores marrom clara e bege.

### **5.5.2 Avaliação da produção de melanina por meio da eletroforese em gel PAGE não-desnaturante**

O resultado calculado pelo programa Kodak 3.5.4 foi na forma de intensidade da coloração do pigmento melanínico das bandas. A interferência do gel foi eliminada subtraindo-se a intensidade correspondente à região de mesma área sem mancha (poço sem amostra) e as proporções calculadas atribuindo valor 1,0 à intensidade de melanina com menor valor dentre as amostras.

### **5.5.3 Sensibilidade aos antifúngicos**

Os critérios para interpretação dos resultados da sensibilidade aos antifúngicos nas diferentes metodologias empregadas foram os seguintes:

#### **5.5.3.1 Método de difusão em agar a partir de disco com e sem adição de melanina**

Para o fluconazol, o diâmetro do halo de inibição foi medido e o “endpoint” considerado quando houve 80 % de inibição do crescimento, segundo documento M44-A (CLSI, 2004), Vandenbossche e colaboradores (2002) e Pfaller e colaboradores (2005a),

sendo as amostras classificadas como susceptível (S) para halo  $\geq 19$  mm, susceptível dose dependente (SDD) para halo entre 15–18 mm e como resistente (R) para halo  $\leq 14$  mm para o fluconazol. Para os padrões ATCC de *Candida* spp. foram seguidos os critérios de limite para o fluconazol descritos no documento M44-A (CLSI, 2004).

Para anfotericina B a interpretação dos testes frente às amostras e os padrões de *Candida* spp. foi realizada segundo o fabricante (CECON<sup>®</sup>), sendo o halo de inibição medido quando houve 100 % de inibição do crescimento. As amostras foram consideradas sensíveis (S) se os halos foram  $> 10$  mm e intermediárias ou resistentes (R) se os halos foram  $\leq 10$  mm.

As leituras foram realizadas após 48 h e 72 h de incubação.

#### 5.5.3.2 Método difusão em agar a partir de fita (E-test<sup>®</sup>) com e sem adição de melanina

A interpretação dos resultados foi realizada conforme critérios estabelecidos pelo fabricante E-test<sup>®</sup>. Para o fluconazol a concentração inibitória mínima (CIM) foi estabelecida como a menor concentração na qual as bordas da zona elíptica de inibição intercepta a escala da fita e, na presença de crescimento residual no interior da zona de inibição (*trailing*), o valor de CIM foi estabelecido como o ponto onde houve aproximadamente inibição de 80 % do crescimento (PFALLER, 2000).

A CIM para anfotericina B foi lida no ponto em que uma zona de inibição completa interceptou a fita (LOZANO-CHIU et al., 1998).

A classificação do perfil de sensibilidade antifúngica conforme CLSI (M27-A2, 2002) para o fluconazol é sensível (S) se a CIM for  $\leq 8$   $\mu\text{g/mL}$ , sensível dose dependente (S-DD) para CIM entre 16 e 32  $\mu\text{g/mL}$  e resistente (R) para CIM  $\geq 64$   $\mu\text{g/mL}$ . Para *Candida* spp. Aller e colaboradores (2000a) consideram resistência ao fluconazol CIM  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$  e Pfaller e colaboradores (2004) utilizando a metodologia CLSI (M27-A2, 2002) descreve amostras de *C. neoformans* com CIM  $\geq 32$   $\mu\text{g/mL}$  como possíveis resistentes. Neste trabalho adotou-se como resistente ao fluconazol amostras com CIM  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$ , conforme Aller e colaboradores (2000a).

Para anfotericina B ainda não estão estabelecidos valor de CIM, Lozano-Chiu e colaboradores (1998) estudando amostras de *C. neoformans* resistentes a anfotericina B com E-test<sup>®</sup> em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com glicose considerou-se sensível (S) CIM  $\leq 0,5$   $\mu\text{g/mL}$  e como resistente (R) CIM  $\geq 1,0$   $\mu\text{g/mL}$ . Maxweel e colaboradores (2003)

estudando 162 amostras de *C. neoformans* em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com glicose (2%) considerou-se sensível (S) CIM  $\leq$  1,0  $\mu\text{g/mL}$  e como resistente (R) CIM  $>$  1,0  $\mu\text{g/mL}$ .

## 5.6 DEFINIÇÕES QUANTO AO PERFIL DE SENSIBILIDADE

### Sensível (S)

- ✓ Um microrganismo é considerado sensível de acordo com um nível de atividade antifúngica associado a uma elevada probabilidade de sucesso terapêutico.
- ✓ Um microrganismo é classificado como sensível de acordo com os valores de corte estabelecidos para cada antifúngico em testes fenotípicos padronizados.
- ✓ Os valores do ponto de corte podem sofrer alterações conforme as circunstâncias.

### Sensível dependente da dose (S-DD)

- ✓ Nova categoria de classificação recentemente descrita pelo subcomitê em testes de sensibilidade a agentes antifúngicos do CLSI.
- ✓ O microrganismo é definido como sensível apenas se o antifúngico atingir, no sangue, as máximas concentrações possíveis.

### Intermediário (I)

- ✓ Um microrganismo é considerado como intermediário de acordo com um nível de atividade antifúngica associado a um efeito terapêutico indeterminado porque este efeito está na dependência de um ajuste da dosagem e farmacocinética do antifúngico para cada caso em particular.

### Resistência (R)

- ✓ Um microrganismo é considerado como resistente de acordo com um nível de atividade antifúngica associado a uma elevada probabilidade de falência terapêutica.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 PRODUÇÃO DE MELANINA EM MEIO SÓLIDO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

As placas com os meios contendo L-dopa e com pH 5, 6 e 7 foram inoculadas com 4 (quatro) amostras de *C. neoformans* na quantidade padrão de  $1,5 \times 10^5$  células e incubadas a 25 °C, 30 °C e 35 °C por 8 dias. A melanização foi observada diariamente, as placas foram fotografadas no oitavo dia de incubação e a intensidade de melanização avaliada atribuindo-se uma escala de 1 a 5 (TABELA 6.1 e FIGURAS 6.1 a 6.9).

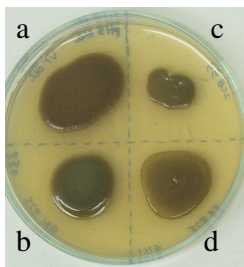


Figura 6.1 – Melanização das amostras clínicas de *C. neoformans*: VP Bet (a), ICB 189 (b), ICB 95 (c) e ICB 88 (d) após 8 dias em meio com **pH 5,0** e incubação a **25°C**.

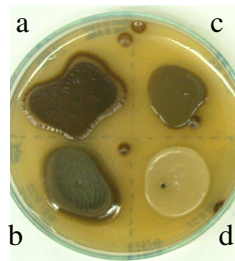


Figura 6.2 – Melanização das amostras clínicas de *C. neoformans*: VP Bet (a), ICB 189 (b), ICB 95 (c) e ICB 88 (d) após 8 dias em meio com **pH 5,0** e incubação a **30°C**.

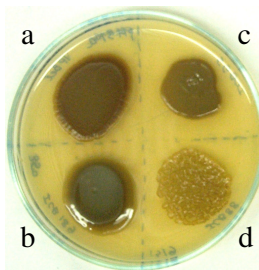


Figura 6.3 – Melanização das amostras clínicas de *C. neoformans*: VP Bet (a), ICB 189 (b), ICB 95 (c) e ICB 88 (d) após 8 dias em meio com **pH 5,0** e incubação a **35°C**.

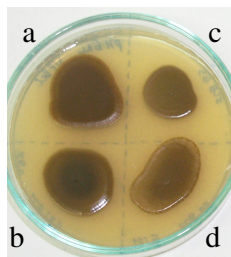


Figura 6.4 – Melanização das amostras clínicas de *C. neoformans*: VP Bet (a), ICB 189 (b), ICB 95 (c) e ICB 88 (d) após 8 dias em meio com **pH 6,0** e incubação a **25°C**.

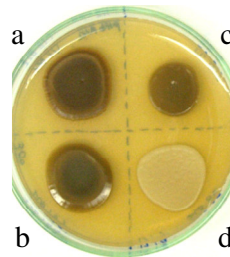


Figura 6.5 – Melanização das amostras clínicas de *C. neoformans*: VP Bet (a), ICB 189 (b), ICB 95 (c) e ICB 88 (d) após 8 dias em meio com **pH 6,0** e incubação a **30°C**.

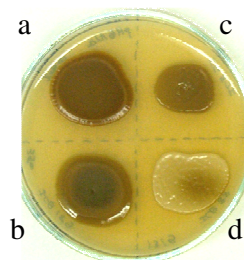


Figura 6.6 – Melanização das amostras clínicas de *C. neoformans*: VP Bet (a), ICB 189 (b), ICB 95 (c) e ICB 88 (d) após 8 dias em meio com **pH 6,0** e incubação a **35°C**.

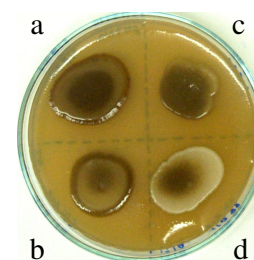


Figura 6.7 – Melanização das amostras clínicas de *C. neoformans*: VP Bet (a), ICB 189 (b), ICB 95 (c) e ICB 88 (d) após 8 dias em meio com **pH 7,0** e incubação a **25°C**.

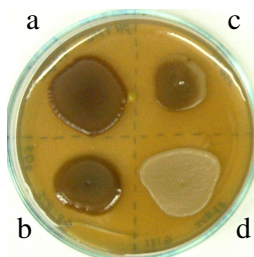


Figura 6.8 – Melanização das amostras clínicas de *C. neoformans*: VP Bet (a), ICB 189 (b), ICB 95 (c) e ICB 88 (d) após 8 dias em meio com **pH 7,0** e incubação a **30°C**.

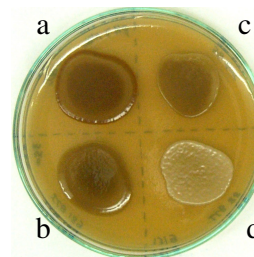


Figura 6.9 – Melanização das amostras clínicas de *C. neoformans*: VP Bet (a), ICB 189 (b), ICB 95 (c) e ICB 88 (d) após 8 dias em meio com **pH 7,0** e incubação a **35°C**.

Tabela 6.1 - Resultados da melanização de amostras ambientais, clínicas e do padrão ATCC 90112 de *C. neoformans* crescidas em meio sólido sob diferentes temperaturas (25 °C, 30 °C e 35 °C) e pH (5,0; 6,0 e 7,0) após 8 dias de incubação.

	Amostra	pH	Temp. (°C)	Cor*	Cor*
C L Í N I C A S	VP Bet	5	25	3	4
			30	3	4
			35	2	3
		6	25	4	3
			30	3	3
			35	2	3
		7	25	4	3
			30	4	3
			35	NC	4
	ICB 189	5	25	3	5
			30	3	5
			35	NC	5
		6	25	4	4
			30	3	4
			35	1	5
		7	25	4	4
			30	4	3
			35	NC	3
	ICB 95	5	25	3	5
			30	3	3
			35	1	4
		6	25	3	4
			30	3	2
			35	1	3
		7	25	NC	4
			30	NC	2
			35	NC	3
	ICB 88	5	25	3	4
			30	2	1
			35	NC	2
		6	25	3	3
			30	3	1
			35	NC	2
		7	25	3	4
			30	2	1
			35	NC	2

Continua

\* Escala de cores: 1 – bege, 2 – marrom claro, 3 – marrom, 4 – marrom escuro, 5 – preto e NC – não cresceu.

Tabela 6.1 - Resultados da melanização de amostras ambientais, clínicas e do padrão ATCC 90112 de *C. neoformans* crescidas em meio sólido sob diferentes temperaturas (25 °C, 30 °C e 35 °C) e pH (5,0; 6,0 e 7,0) após 8 dias de incubação (Continuação).

	Amostra	pH	Temp. (°C)	Cor*	Cor*
<b>C L Í N I C A S</b>	<b>ICB 155</b>	5	25	3	3
			30	3	3
			35	2	3
		6	25	3	3
			30	3	3
			35	3	3
		7	25	3	3
			30	3	3
			35	3	4
<b>A M B I E N T A I S</b>	<b>B 51</b>	5	25	4	4
			30	4	5
			35	2	4
		6	25	4	4
			30	3	3
			35	2	4
		7	25	3	4
			30	3	4
			35	2	3
	<b>C 18</b>	5	25	4	4
			30	4	5
			35	3	4
		6	25	4	3
			30	3	3
			35	3	4
		7	25	3	3
			30	3	3
			35	2	3
	<b>B 96</b>	5	25	4	4
			30	4	4
			35	2	5
		6	25	4	4
			30	3	2
			35	2	4
		7	25	3	2
			30	3	2
			35	2	2

Continua

\* Escala de cores: 1 – bege, 2 – marrom claro, 3 – marrom, 4 – marrom escuro, 5 – preto e NC – não cresceu.

Tabela 6.1 - Resultados da melanização de amostras ambientais, clínicas e do padrão ATCC 90112 de *C. neoformans* crescidas em meio sólido sob diferentes temperaturas (25 °C, 30 °C e 35°C) e pH (5,0; 6,0 e 7,0) após 8 dias de incubação.

	Amostra	pH	Temp. (°C)	Cor*	Cor*
<b>A M B I E N T A I S</b>	<b>BO 2</b>	5	25	3	3
			30	3	4
			35	2	4
		6	25	4	3
			30	3	3
			35	2	3
		7	25	4	4
			30	4	3
			35	NC	3
	<b>ICB 178</b>	5	25	3	3
			30	3	4
			35	2	4
		6	25	3	3
			30	3	3
			35	2	3
		7	25	4	3
			30	4	3
			35	3	3
<b>P A D R Ã O</b>	<b>ATCC 90112</b>	5	25	4	4
			30	4	1
			35	**	4
		6	25	4	3
			30	3	2
			35	**	2
		7	25	3	3
			30	3	2
			35	2	2

Conclusão

\* Escala de cores: 1 – bege, 2 – marrom claro, 3 – marrom, 4 – marrom escuro, 5 – preto e NC – não cresceu.

\*\* não foi realizado.

## 6.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MELANINA POR MEIO DA ELETROFORESE EM GEL PAGE NÃO-DESNATURANTE

Os géis PAGE com as bandas de melanina, os resultados da quantificação e os gráficos para análise encontram-se a seguir.

### 6.2.1 Resultados da etapa de extração das amostras de *Cryptococcus neoformans*

As amostras, o padrão de *C. neoformans* ATCC 90112 e o padrão de lacase (Sigma<sup>®</sup>) apresentaram bandas nos géis após revelação na presença de L-dopa (FIGURAS 6.10 a 6.17).

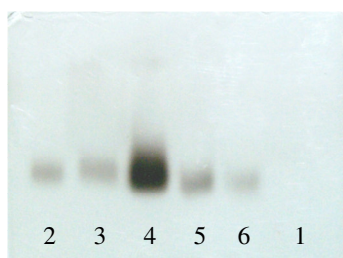


Figura 6.10 – Gel 1 - amostras **clínicas** de *C. neoformans*: ICB 81 (2), ICB 154 (3), VP Bet (4), ICB 95 (5), HNR 41 (6) e branco (1).

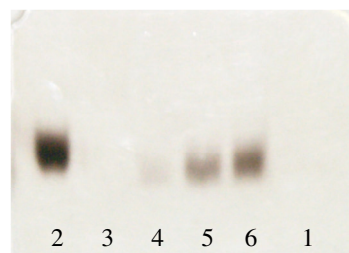


Figura 6.11 – Gel 2 - amostras **clínicas** de *C. neoformans*: RO1 (2), HNR 39 (3), ICB 155 (4), CN 103 (5), ICB 23 (6) e branco (1).

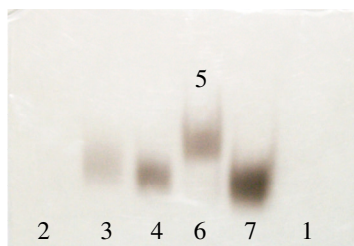


Figura 6.12 – Gel 3 - amostras **clínicas** de *C. neoformans*: ICB 169 (2), ICB 89 RN (3), ICB 189 (4), ICB 88 (5 e 6), RO2 (7) e branco (1).

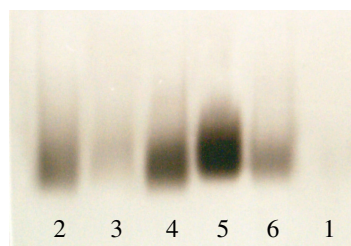


Figura 6.13 – Gel 4 - amostras **ambientais** de *C. neoformans*: Sul amb 3 (2), B 60 (3), Sul amb 1 (4), ICB 184 (5), B 52 (6) e branco (1).

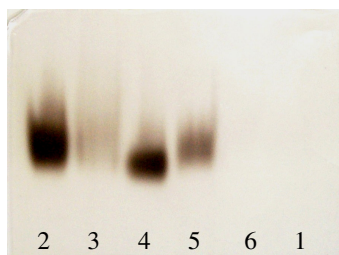


Figura 6.14 – Gel 5 - amostras **ambientais** de *C. neoformans*: B 51 (2), B 79 (3), BO 5 (4), BO 2 (5), ICB 187 (6) e branco (1).

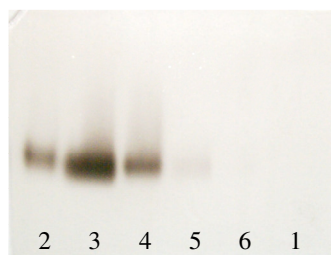


Figura 6.15 – Gel 6 - amostras **ambientais** de *C. neoformans*: ICB 178 (2), C 7 (3), C 18 (4), B 78 (5), B 96 (6) e branco (1).



Figura 6.16 – Gel com padrão ATCC 90112 de *C. neoformans* (2), branco (1).

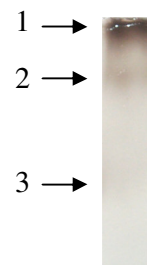


Figura 6.17 – Gel com padrão da Lacase de *Rhus vernificera* Sigma® na concentração de 2,8 µg/µL. As setas indicam a separação da enzima em três bandas visíveis no gel, confirmando a obtenção de melanina.

## 6.2.2 Quantificação de melanina das amostras de *C. neoformans* obtidas a partir das bandas do gel de poliacrilamida.

A intensidade das bandas de melanina e dos controles nos géis foram quantificadas no programa Kodak 1 D 3.5.4. A intensidade correspondente somente à melanina calculou-se subtraindo a intensidade do controle da intensidade total da banda de melanina (Gráficos 6.1 e 6.2). Para cálculo das proporções atribuiu-se valor 1,0 à amostra com menor intensidade de melanina (TABELA 6.2).

Tabela 6.2 - Intensidades das bandas com e sem melanina nos géis e as proporções de melanina das 15 amostras clínicas, 15 amostras ambientais e o padrão ATCC 90112 de *C. neoformans*.

	Amostra	Gel/banda	Intensidade da banda <sup>a</sup>	Intensidade da melanina <sup>b</sup>	Proporção <sup>c</sup>
CLÍNICA	Branco 1	1/1	145,787		
	ICB 81	1/2	172,903	27,116	8,12
	ICB 154	1/3	187,234	41,447	12,42
	VPBet	1/4	246,117	100,330	30,05
	ICB 95	1/5	186,855	41,068	12,30
	HNR 41	1/6	165,585	19,798	5,93
	Branco 2	2/1	133,965		
	RO1	2/2	232,818	98,853	29,61
	HNR 39	2/3	139,029	5,064	1,52
	ICB 155	2/4	154,368	20,402	6,11
	CN 103	2/5	203,238	69,273	20,75
	ICB 23	2/6	218,818	84,853	25,42
	Branco 3	3/1	122,018		
	ICB 169	3/2	136,880	14,862	4,45
	ICB 89 RN	3/3	163,955	41,937	12,56
AMBIENTAL	ICB 189	3/4	173,046	51,028	15,28
	ICB 88	3/5	178,3171	56,299	16,87
	ICB 88	3/6	135,733	13,715	4,11
	RO2	3/7	319,614	197,596	59,20
	Branco 4	4/1	138,000		
	Sul amb 3	4/2	219,268	81,268	24,34
	B 60	4/3	184,975	46,975	14,07
	Sul amb 1	4/4	219,558	81,558	24,43
	ICB 184	4/5	243,045	105,045	31,47
	B 52	4/6	187,928	49,928	14,96
	Branco 5	5/1	134,600		
	B 51	5/2	240,288	105,688	31,66
	B 79	5/3	186,744	52,144	15,62
	BO 5	5/4	226,639	92,039	27,57
	BO 2	5/5	198,858	64,258	19,25
PADRÃO	ICB 187	5/6	137,938	3,338	<b>1,00</b>
	Branco 6	6/1	120,266		
	ICB 178	6/2	203,911	83,645	25,06
	C 7	6/3	243,238	122,972	36,84
	C 18	6/4	204,308	84,042	25,18
	B 78	6/5	152,317	32,051	9,60
	B 96	6/6	127,410	7,144	2,14
	Branco 7	7/1	150,321		
	ATCC 90112	7/2	193,845	43,524	13,04

a – Calculada pelo programa Kodak 1D.

b - Calculada subtraindo a intensidade de melanina da banda pela intensidade do controle.

c - Calculada atribuindo valor 1,0 à amostra com menor intensidade de melanina.

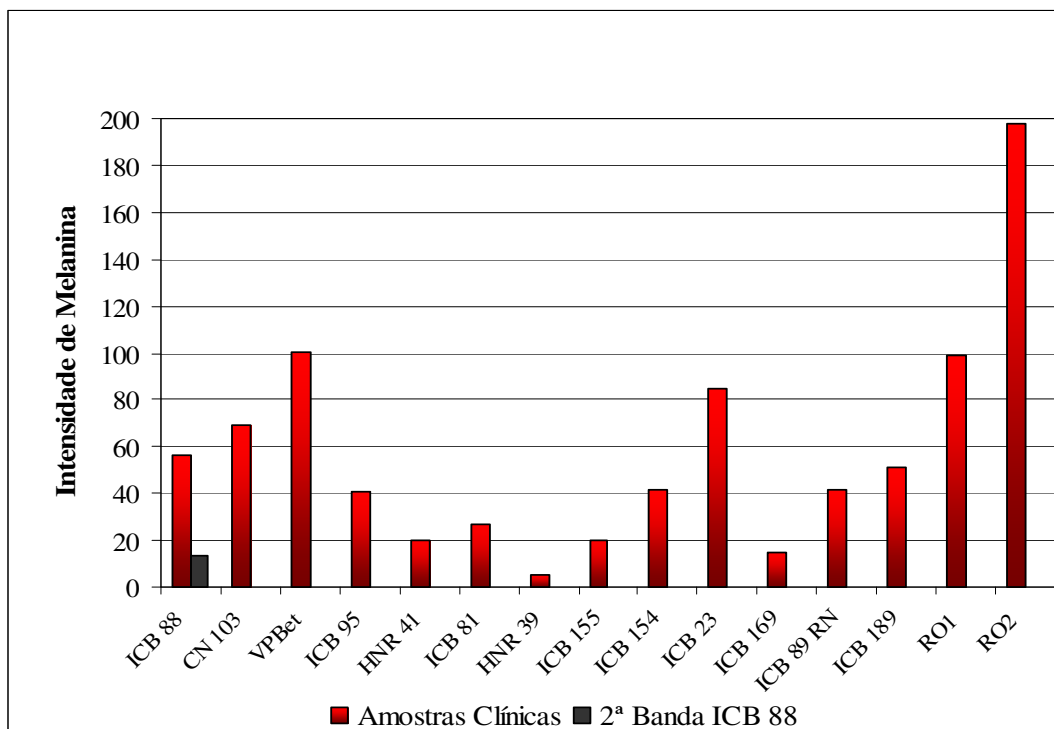


Gráfico 6.1 - Intensidades de melanina das amostras clínicas de *C. neoformans* após densitometria das bandas obtidas por eletroforese não-desnaturante e reveladas em tampão L-dopa.

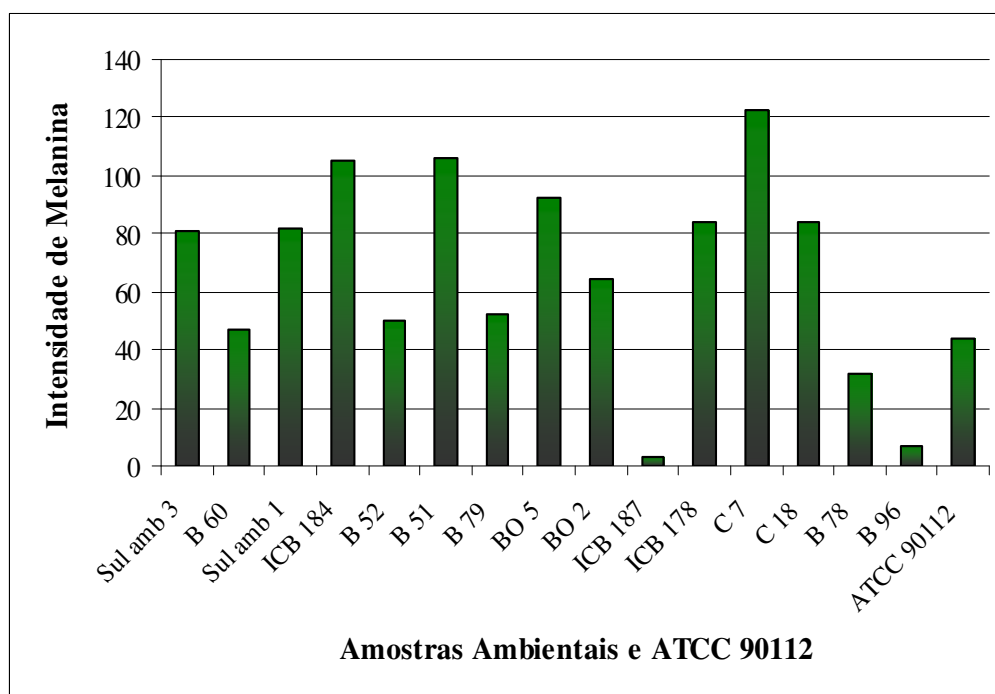


Gráfico 6.2 - Intensidades de melanina das amostras ambientais e do padrão ATCC 90112 de *C. neoformans* após densitometria das bandas obtidas por eletroforese não-desnaturante e reveladas em tampão L-dopa.

As proporções de melanina calculadas das amostras de *C. neoformans* (ambientais, clínicas e o padrão ATCC 90112) foram distribuídas em intervalos para avaliação da dispersão dos resultados dentre os amostras de diferente origem (QUADRO 6.1).

Quadro 6.1 – Distribuição das proporções de melanina das amostras de *C. neoformans* (clínicas, ambientais e o padrão ATCC 90112) em intervalos e porcentagens.

	Número de amostras contidas nos intervalos de proporções* de melanina e porcentagens						Total de bandas
	1-9,9	10-19,9	20-29,9	30-39,9	40-49,9	50-59,9	
Clínicas	6 (37,5)	5 (31,25)	3 (18,75)	1 (6,25)	0	1 (6,25)	16**
Ambientais	3 (20,0)	4 (26,67)	5 (33,33)	3 (20,0)	0	0	15
Padrão ATCC 90112	0	1 (100,0)	0	0	0	0	1

\* As proporções de melanina expressam quantas vezes as amostras apresentaram intensidade de melanina maior frente a amostra de menor intensidade de melanina.

\*\* A amostra ICB 88 apresentou duas bandas de melanina que foram quantificadas.

### 6.3 SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

Os resultados dos testes de sensibilidade nas metodologias de difusão em agar a partir de disco e fita (E-test<sup>®</sup>) foram realizados com e sem adição de melanina frente ao fluconazol e anfotericina B encontram-se dispostos nas tabelas e alguns podem ser observados nas fotos a seguir. A quantidade de partículas de melanina foi padronizada em  $10^7$  partículas por mL.

#### 6.3.1 Obtenção das partículas de melanina

As amostras de *C. neoformans* após incubação em meio mínimo com 1 mM de L-dopa por 21 dias a 30°C e sob agitação de 150 rpm, passaram pelo processo de extração para obtenção das partículas de melanina descrito em materiais e métodos (FIGURA 6.18).

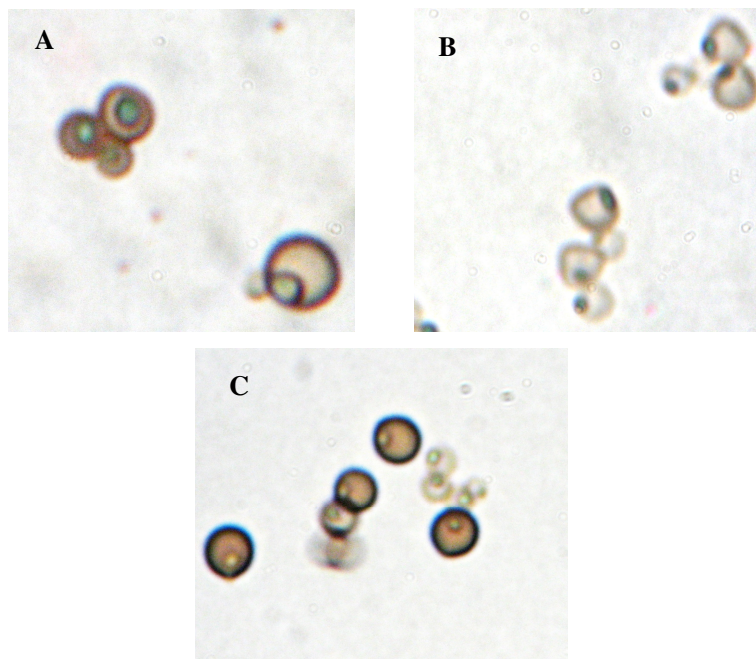


Figura 6.18 – Partículas de melanina das amostras clínicas ICB 95 (A), ICB 189 (B) e ambiental ICB 178 (C) de *C. neoformans*. Aumento de 100X. As fotos são exemplos de algumas das partículas de melanina obtidas e mostram os diferentes tamanhos e intensidades de pigmentação.

#### 6.3.1.1 Tindalização parcial

Os tubos com caldo BHI inoculados com 50  $\mu$ L das suspensões das partículas de melanina (imediatamente depois da tindalização parcial e após 48 h) e o controle negativo (tubo com caldo BHI estéril) apresentaram-se límpidos após 3 (três) dias de incubação a 30°C e os controles positivos (tubo com caldo BHI inoculado com alíquota de suspensão das partículas de melanina antes da tindalização) apresentaram elevada turvação.

#### 6.3.2 Teste de sensibilidade a antifúngicos por difusão em agar a partir de disco com e sem adição de melanina

Os resultados da sensibilidade frente ao fluconazol e anfotericina B sem adição e com adição de melanina foram expressos na tabela 6.3 e Figuras 6.19 a 6.22.

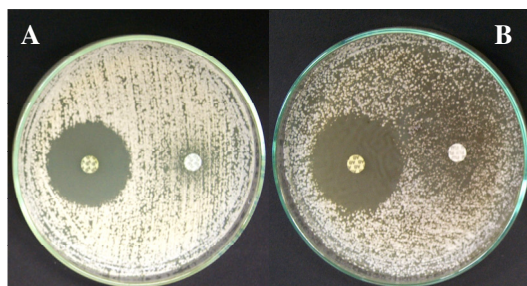


Figura 6.19 – Placas do teste de sensibilidade da amostra **ICB 88** com discos de anfotericina B (à esquerda) e fluconazol (à direita) da placa sem adição (A) e com adição (B) de partículas de melanina.

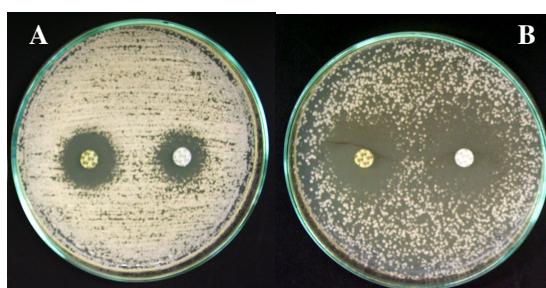


Figura 6.20 – Placas do teste de sensibilidade da amostra **BO 2** com discos de anfotericina B (à esquerda) e fluconazol (à direita) da placa sem adição (A) e com adição (B) de partículas de melanina.

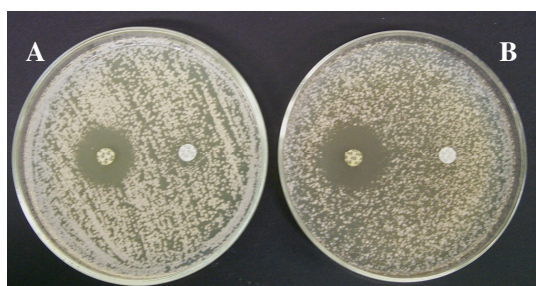


Figura 6.21 – Placas do teste de sensibilidade da amostra **ICB 189** com discos de anfotericina B (à esquerda) e fluconazol (à direita) da placa sem adição (A) e com adição (B) de partículas de melanina.

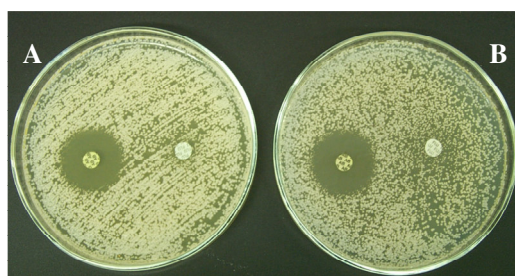


Figura 6.22 – Placas do teste de sensibilidade da amostra **B 96** com discos de anfotericina B (à esquerda) e fluconazol (à direita) da placa sem adição (A) e com adição (B) de partículas de melanina.

Tabela 6.3 – Avaliação da sensibilidade aos antifúngicos fluconazol (FLU) e anfotericina B (AB) através da metodologia de difusão em agar a partir de disco (Documento M44 A, CLSI, 2004), com e sem adição de melanina das amostras e dos padrões: *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112 e *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

			Tempo (h)	Sem Partículas Melanina			Com Partículas Melanina		
				24	48	72	24	48	72
			Antifúngicos	Halo mm	Halo mm	Halo mm	Halo mm	Halo mm	Halo mm
A M O S T R A S	P A D R Õ E S	<i>C.krusei</i> ATCC 6258	FLU	9	8	8			
			AB	18	14	14			
		<i>C.parapsilosis</i> ATCC 22019	FLU	22	18	17			
			AB	23	23	21			
		<i>C. neoformans</i> ATCC 90112	FLU	-	11	8	-	9	9
			AB	-	33	35	-	30	31
	C L Í N I C A S	VP Bet	FLU	-	19	12	-	15	10
			AB	-	26	22	-	24	21
		ICB 189	FLU	-	14	12	-	7	7
			AB	-	22	20	-	21	20
		ICB 95	FLU	-	14	12	-	-	27
			AB	-	29	27	-	-	38
		ICB 155	FLU	-	22	20	-	25	19
			AB	-	33	30	-	38	38
		ICB 88	FLU	-	31	14	-	29	18
			AB	-	33	31	-	35	30
	A M B I E N T A I S	ICB 178	FLU	-	23	19	-	28	27
			AB	-	23	19	-	25	23
		B 96	FLU	-	10	10	-	12	7
			AB	-	25	22	-	22	21
		B 51	FLU	-	19	10	-	11	7
			AB	-	23	19	-	20	16
		BO 2	FLU	-	22	18	-	35	28
			AB	-	27	19	-	32	21
		C 18	FLU	-	7	7	-	7	7
			AB	-	25	23	-	28	24

- Após 48h pouco crescimento das colônias impossibilitando leitura.

### 6.3.2.1 Classificação das amostras quanto à sensibilidade aos antifúngicos na metodologia de difusão em agar a partir de disco

As amostras e o padrão ATCC 90112 de *C. neoformans* foram classificados conforme resultados após 48h e 72h de incubação (TABELA 6.4) e para anfotericina B (TABELA 6.5).

O percentual dos perfis de sensibilidade também foram calculados (QUADRO 6.2).

Os resultados dos testes de sensibilidade para os padrões *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 estão de acordo com o documento M44-A (CLSI, 2004).

Tabela 6.4 - Perfil de sensibilidade antifúngica de amostras clínicas, ambientais e o padrão ATCC 90112 de *Cryptococcus neoformans* através da difusão em agar a partir de disco com fluconazol, com e sem adição de melanina após 48 h e 72 h de incubação.

	Amostra	Mel. <sup>1</sup>	Sensibilidade			Amostra	Mel.	Sensibilidade	
			48 h	72 h				48 h	72 h
C L Í N I C A S	VP Bet	Não <sup>2</sup>	S	R	A M B I E N T A I S	ICB 178	Não	S	S
		Sim <sup>3</sup>	I	R			Sim	S	S
	ICB 189	Não	R	R		B 96	Não	R	R
		Sim	R	R			Sim	R	R
	ICB 95	Não	R	R		B 51	Não	S	R
		Sim	*	S			Sim	R	R
	ICB 155	Não	S	S		BO 2	Não	S	I
		Sim	S	S			Sim	S	S
	ICB 88	Não	S	R		C 18	Não	R	R
		Sim	S	I			Sim	R	R
	ATCC 90112	Não	R	R					
		Sim	R	R					

S – Sensível (halo  $\geq 19$ mm); I – Intermediário (halo entre 15-18mm); R – Resistente (halo  $\leq 14$ mm).

\* Após 48h pouco crescimento das colônias impossibilitando leitura.

1- Mel.: Melanina; 2 – Não: sem adição de melanina; 3 – Sim: com adição de melanina.

Tabela 6.5 - Perfil de sensibilidade antifúngica de amostras clínicas, ambientais e o padrão ATCC 90112 de *C. neoformans* através da difusão em agar a partir de disco com anfotericina B, com e sem adição de melanina após 48 h e 72 h de incubação.

	Amostra	Mel. <sup>1</sup>	Sensibilidade			Amostra	Mel.	Sensibilidade	
			48 h	72 h				48 h	72 h
C L Í N I C A S	VP Bet	Não <sup>2</sup>	S	S	A M B I E N T A I S	ICB 178	Não	S	S
		Sim <sup>3</sup>	S	S			Sim	S	S
	ICB 189	Não	S	S		B 96	Não	S	S
		Sim	S	S			Sim	S	S
	ICB 95	Não	S	S		B 51	Não	S	S
		Sim	*	S			Sim	S	S
	ICB 155	Não	S	S		BO 2	Não	S	S
		Sim	S	S			Sim	S	S
	ICB 88	Não	S	S		C 18	Não	S	S
		Sim	S	S			Sim	S	S
	ATCC 90112	Não	S	S					
		Sim	S	S					

S – Sensível (halo  $> 10$ mm); Intermediário (I) ou Resistente (R) (halo  $\leq 10$ mm).

\* Após 48h pouco crescimento das colônias impossibilitando leitura.

1- Mel.: Melanina; 2 – Não : sem adição de melanina; 3 – Sim: com adição de melanina.

Quadro 6.2 – Avaliação percentual do perfil de sensibilidade antifúngica de amostras clínicas (Cl), ambientais (Am) e do padrão ATCC 90112 (Pd) de *C. neoformans* conforme resultados da difusão em agar a partir de disco (Documento M44 A, CLSI, 2004), com e sem adição de melanina a 48 h e 72 h.

Antifúngico	Melanina	Horas	Sensível (%)	Intermed. (%)	Resistente (%)
Fluconazol	Ausente	48	6 (54,6) 3 Cl e 3 Am	0 (0)	5 (45,4) 2 Cl, 2 Am e Pd
		72	2 (18,2) 1 Cl e 1 Am	1 (9,1) 1 Am	8 (72,7) 4 Cl, 3 Am e Pd
	Presente	48*	4 (40,0) 2 Cl e 2 Am	1 (10,0) 1 Cl	5 (50,0) 1 Cl, 3 Am e Pd
		72	4 (36,4) 2 Cl e 2 Am	1 (9,1) 1 Cl	6 (54,6) 2 Cl, 3 Am e Pd
Anfotericina B	Ausente	48	11 (100,0) Todas amostras	0 (0)	0 (0)
		72	11 (100,0) Todas amostras	0 (0)	0 (0)
	Presente	48*	10 (100,0) Todas amostras	0 (0)	0 (0)
		72	11 (100,0) Todas amostras	0 (0)	0 (0)

\* Calculado com 10 amostras, ICB 95 com pouco crescimento às 48h de incubação.

### 6.3.3 Teste de sensibilidade a antifúngicos por difusão em agar a partir de fita (E-test®) sem e com adição de melanina

As amostras de *C. neoformans* foram submetidas ao E-test® de fluconazol e anfotericina B com e sem adição de melanina. A quantidade de melanina adicionada na superfície do meio foi a mesma utilizada no método de avaliação da sensibilidade por difusão a partir de disco.

A leitura e interpretação dos resultados foi realizada segundo critérios do fabricante, sendo a CIM para o fluconazol considerada a concentração na qual houve aproximadamente 80 % de inibição de crescimento (PFALLER, 2000) e para anfotericina B a CIM onde ocorreu 100 % de inibição (LOZANO-CHIU et al., 1998).

Os valores das CIM obtidas estão dispostos na Tabela 6.6 (FIGURAS 6.23 a 6.26).



Figura 6.23 – Placas do teste de sensibilidade da amostra **ICB 189** de *C. neoformans* por difusão em agar a partir de fita (E-test) de anfotericina B (à esquerda) e fluconazol (à direita) da placa sem adição (A) e com adição (B) de partículas de melanina.

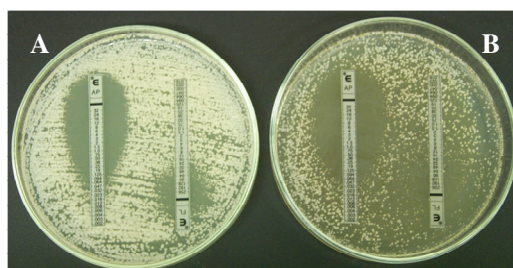


Figura 6.24 – Placas do teste de sensibilidade da amostra **B 96** de *C. neoformans* por difusão em agar a partir de fita (E-test) de anfotericina B (à esquerda) e fluconazol (à direita) da placa sem adição (A) e com adição (B) de partículas de melanina.

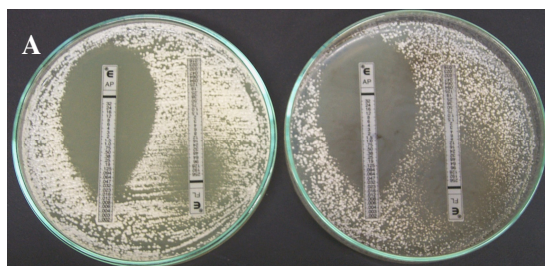


Figura 6.25 – Placas do teste de sensibilidade da amostra **ICB 88** de *C. neoformans* por difusão em agar a partir de fita (E-test) de anfotericina B (à esquerda) e fluconazol (à direita) da placa sem adição (A) e com adição (B) de partículas de melanina.

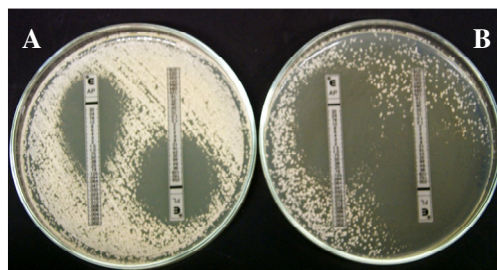


Figura 6.26 – Placas do teste de sensibilidade da amostra **BO 2** de *C. neoformans* por difusão em agar a partir de fita (E-test) de anfotericina B (à esquerda) e fluconazol (à direita) da placa sem adição (A) e com adição (B) de partículas de melanina.

Tabela 6.6 - Avaliação da sensibilidade aos antifúngicos fluconazol (FLU) e anfotericina B (AB) através da metodologia de difusão em agar a partir de fita (E-test®) sem e com adição de melanina das amostras e dos padrões: *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112, *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

			Tempo (h)	Sem Partículas Melanina			Com Partículas Melanina		
				24	48	72	24	48	72
			Antifúngicos	E-test µg/mL	E-test µg/mL	E-test µg/mL	E-test µg/mL	E-test µg/mL	E-test µg/mL
A M O S T R A S	P A D R Õ E S	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	FLU	96	128	128	-	-	-
			AB	0,19	0,38	0,50	-	-	-
		<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	FLU	6	8	8	-	-	-
			AB	0,064	0,064	0,094	-	-	-
		<i>C. neoformans</i> ATCC 90112	FLU	-	96	128	-	256	64
			AB	-	0,004	0,006	-	0,006	0,012
	C L Í N I C A S	VP Bet	FLU	-	32	64	-	64	64
			AB	-	0,023	0,064	-	0,19	0,25
		ICB 189	FLU	-	96	96	-	128	256
			AB	-	0,064	0,125	-	0,19	0,38
		ICB 95	FLU	-	32	96	-	*	96
			AB	-	0,016	0,047	-	*	0,023
		ICB 155	FLU	-	6	8	-	8	12
			AB	-	0,008	0,012	-	0,016	0,064
		ICB 88	FLU	-	4	24	-	8	24
			AB	-	0,008	0,032	-	0,016	0,047
	A M B I E N T A I S	ICB 178	FLU	-	1,0	1,5	-	3	3
			AB	-	0,064	0,19	-	0,094	0,5
		B 96	FLU	-	4	48	-	8	32
			AB	-	0,064	0,19	-	0,094	0,25
		B 51	FLU	-	32	32	-	64	96
			AB	-	0,047	0,125	-	0,19	0,38
		BO 2	FLU	-	3	6	-	4	2
			AB	-	0,032	0,19	-	0,064	0,38
		C 18	FLU	-	48	96	-	64	256
			AB	-	0,047	0,094	-	0,125	0,19

\* Após 48h pouco crescimento das colônias impossibilitando leitura.

### 6.3.3.1 Classificação das amostras quanto à sensibilidade aos antifúngicos na metodologia de difusão em agar a partir de fita (E-test®)

As amostras e o padrão ATCC 90112 de *C. neoformans* foram classificados conforme perfil de sensibilidade antifúngica para o fluconazol (TABELA 6.7) e anfotericina B

(TABELA 6.8). O percentual dos perfis de sensibilidade também foi calculado (QUADRO 6.3).

Os resultados da CIM 50 e CIM 90 sem e com adição de melanina após 48 h e 72 h de incubação estão dispostos na Tabela 6.9 e os resultados dos testes de sensibilidade para o padrão *Candida krusei* ATCC 6258 está de acordo com o documento M27-A2 (CLSI, 2002) para anfotericina B e fluconazol, embora para este último tenha apresentado perfil de R com valor de CIM (128 µg/mL) acima da faixa proposta no documento (16-64 µg/mL).

Para o padrão de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 houve concordância com o proposto no documento M27-A2 (CLSI, 2002) para o fluconazol, e no caso da anfotericina B, apesar de sensível, o valor obtido para CIM apresentou-se menor (0,064 µg/mL) do que a faixa proposta no documento (0,25-1,0 µg/mL).

Tabela 6.7 - Perfil de sensibilidade antifúngica de amostras clínicas, ambientais e do padrão ATCC 90112 de *Cryptococcus neoformans* através da metodologia de difusão em agar a partir de fita (E-test®) para o fluconazol, com e sem adição de melanina após 48 h e 72 h de incubação.

	Amostra	Mel. <sup>1</sup>	Sensibilidade			Amostra	Mel.	Sensibilidade	
			48 h	72 h				48 h	72 h
C L Í N I C A S	VP Bet	Não <sup>2</sup>	SDD/R	R	A M B I E N T A I S	ICB 178	Não	S	S
		Sim <sup>3</sup>	R	R			Sim	S	S
	ICB 189	Não	R	R		B 96	Não	S	SDD/R
		Sim	R	R			Sim	S	S-DD/R
	ICB 95	Não	S-DD/R	R		B 51	Não	S-DD/R	S-DD/R
		Sim	*	R			Sim	R	R
	ICB 155	Não	S	S		BO 2	Não	S	S
		Sim	S	S			Sim	S	S
	ICB 88	Não	S	S-DD/R		C 18	Não	R <sup>1</sup>	R
		Sim	S	S-DD/R			Sim	R	R
	ATCC 90112	Não	R	R					
		Sim	R	R					

1- Mel : Melanina; 2 – Não: sem adição de melanina; 3 – Sim: com adição de melanina.

Sensível (S) - CIM ≤ 8 µg/mL (M27-A2, CLSI, 2002);

S-DD/R (Sensível dose-dependente/Resistente) – amostra com CIM entre 16-32 µg/mL, classificada como S-DD (M27-A2, CLSI, 2002) ou como R por Aller e col. 2000a;

Resistente – (R) CIM ≥ 64 µg/mL (M27-A2, CLSI, 2002).

\* Após 48h pouco crescimento das colônias impossibilitando leitura.

Tabela 6.8 - Perfil de sensibilidade antifúngica de amostras clínicas, ambientais e o padrão ATCC 90112 de *Cryptococcus neoformans* através da metodologia de difusão em agar a partir de fita (E-test®) para anfotericina B, com e sem adição de melanina após 48 h e 72 h de incubação.

C L Í N I C A S	Amostra	Mel. <sup>1</sup>	Sensibilidade		A M B I E N T A I S	Amostra	Mel.	Sensibilidade	
			48 h	72 h				48 h	72 h
	VP Bet	Não <sup>2</sup>	S	S		ICB 178	Não	S	S
		Sim <sup>3</sup>	S	S			Sim	S	S
	ICB 189	Não	S	S		B 96	Não	S	S
		Sim	S	S			Sim	S	S
	ICB 95	Não	S	S		B 51	Não	S	S
		Sim	*	S			Sim	S	S
	ICB 155	Não	S	S		BO 2	Não	S	S
		Sim	S	S			Sim	S	S
	ICB 88	Não	S	S		C 18	Não	S	S
		Sim	S	S			Sim	S	S
	ATCC 90112	Não	S	S					
		Sim	S	S					

1- Mel : Melanina; 2 – Não: sem adição de melanina; 3 – Sim: com adição de melanina.

S – Sensível cumpre os critérios de Lozano-Chiu e colaboradores (1998) e Maxwell e colaboradores (2003); S\* cumpre somente o critério de Maxwell e colaboradores (2003).

\* Após 48h pouco crescimento das colônias impossibilitando leitura.

Quadro 6.3 – Avaliação percentual do perfil de sensibilidade antifúngica de amostras clínicas, ambientais e do padrão ATCC 90112 de *C. neoformans* através da metodologia de difusão em agar a partir de fita (E-test®) para o fluconazol e anfotericina B, com e sem adição de melanina após 48 e 72 h.

Antifúngico	Mel. <sup>1</sup>	Tempo de incubação (h)	S (%)	S-DD/R (%)	R (%)
FCZ	Não <sup>2</sup>	48	5 (45,4) 2 Cl e 3 Am	3 (27,3) 2 Cl e 1 Am	3 (27,3) 1 Cl, 1 Am e Pd
		72	3 (27,3) 1 Cl e 2 Am	2 (18,2) 1 Cl e 1 Am	6 (54,6) 3 Cl, 2 Am e Pd
	Sim <sup>3</sup>	48*	5 (50,0) 2 Cl e 3 Am	0 (0)	5 (50,0) 2 Cl, 2 Am e Pd
		72	3 (27,3) 1 Cl, 2 Am	2 (18,2) 1 Cl e 1 Am	6 (54,6) 3 Cl, 2 Am e Pd
AMB	Não	48	11 (100,0) Todas amostras	0 (0)	0 (0)
		72	11 (100,0) Todas amostras	0 (0)	0 (0)
	Sim	48*	10 (100,0) Todas amostras	0 (0)	0 (0)
		72	11 (100,0) Todas amostras	0 (0)	0 (0)

1- Mel : Melanina; 2 – Não: sem adição de melanina; 3 – Sim: com adição de melanina.

Am – Amostra ambiental, Cl – Amostra clínica, Pd – padrão ATCC 90112 de *C. neoformans*.

\* Cálculo realizado com 10 amostras.

Sensível (S) - CIM ≤ 8 µg/mL (M27-A2, CLSI, 2002);

S-DD/R (Sensível dose-dependente/Resistente) – amostra com CIM entre 16-32 µg/mL, classificada como S-DD (M27-A2, CLSI, 2002) ou como R por Aller e col. 2000a;

Resistente – (R) CIM ≥ 64 µg/mL (M27-A2, CLSI, 2002).

Tabela 6.9 – Valores de CIM através da metodologia de difusão em agar a partir de fita (E-test<sup>®</sup>) para o fluconazol e anfotericina B, com e sem adição de melanina após 48h e 72 h de incubação das amostras clínicas, ambientais e ATCC 90112 de *C. neoformans*.

Antifúngico	Tempo de incubação (h)	Adição de Melanina	CIM (µg/mL)		
			Faixa	50 <sup>a</sup>	90 <sup>b</sup>
Fluconazol	48	Não	1 a 96	12	96
		Sim <sup>c</sup>	3 a 256	8	96
	72	Não	1,5 a 128	48	96
		Sim	2 a 256	48	192
Anfotericina B	48	Não	0,004 a 0,064	0,032	0,064
		Sim <sup>c</sup>	0,006 a 0,190	0,094	0,190
	72	Não	0,006 a 0,19	0,094	0,19
		Sim	0,012 a 0,50	0,25	0,38

a, b. 50 e 90, CIMs que inibiram 50% e 90% das amostras testadas, respectivamente.

c - Calculado para 10 amostras - ICB 95 com pouco crescimento após 48h de incubação.

Não: sem adição de melanina; Sim: com adição de melanina.

Para avaliação da interferência da melanização e do tempo de incubação nos valores das CIMs das amostras estudadas de *C. neoformans* o Quadro 6.4 apresenta a concordância entre os resultados obtidos entre as CIMs E-test<sup>®</sup> com e sem adição de melanina nos tempos de incubação de 48 e 72h na forma de intervalo. Considerou-se a CIM E-test<sup>®</sup> na ausência de melanina como referência.

Quadro 6.4 – Distribuição das diferenças de CIMs das amostras clínicas, ambientais e ATCC 90112 de *C. neoformans* conforme resultados da difusão em agar a partir de fita (E-test<sup>®</sup>) com e sem adição de melanina após 48 h e 72h de incubação.

Antifúngico	Horas	Nº de amostras com diferenças entre CIMs E-test <sup>®</sup> com e sem adição de melanina							Nº de amostras com CIMs
		> +2	+2	+1	0	-1	-2	> -2	
Fluconazol	48*	2	4	4	0	0	0	0	2
	72	3	1	1	3	1	2	0	3
Anfotericina B	48*	4	3	3	0	0	0	0	4
	72	5	3	2	0	0	1	0	5

\* Calculado para 10 amostras - ICB 95 com pouco crescimento após 48h de incubação.

## 7 DISCUSSÃO

### 7.1 PRODUÇÃO DE MELANINA EM MEIO SÓLIDO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

A produção de pigmentos melanínicos em *C. neoformans* foi descrita, inicialmente, por Staib (1962) e a síntese envolve a presença de substratos difenólicos exógenos como comprovado nos trabalhos de Chaskes e Tyndall (1975 e 1978). A habilidade em crescer sob diferentes condições e expressar fatores relacionados à virulência, como a melanina, é de interesse, pois pode estar associada à capacidade da levedura em causar infecções (CASADEVALL; PERFECT, 1998).

Uma vez que as leveduras melanizadas mantêm-se viáveis após exposições a temperaturas de - 21 °C por 24 h e entre 40-47 °C por 5 min. conferindo “resistência” às células, além de apresentar a propriedade de ligar-se à anfotericina B e caspofungina, a rota de síntese do pigmento pode ser alvo em potencial para desenvolvimento de novos antifúngicos (ROSAS; CASADEVALL, 1997; VAN DUIN; CASADEVALL; NOSANCHUK, 2002; NOSANCHUCK; CASADEVALL, 2006; PERFECT, 2006).

Um estudo sobre a produção de pigmentos por leveduras de importância clínica foi realizado, recentemente, por Chaskes e colaboradores (2008) empregando como substrato L-triptofano em três meios de cultura diferentes. Os testes foram realizados em meio mínimo D-triptofano e D-prolina (m-DTDP), “yeast carbon base” com D-triptofano e D-prolina (YCB-DTDP) e meio frutose D-triptofano glicina (m-FDTG) frente à *Candida albicans*, *C. neoformans* e *C. gattii*. De acordo com os resultados observaram-se: diferenças no crescimento entre *C. neoformans* e *C. gattii* havendo crescimento apenas deste último nos meios m-DTDP e YCB-DTDP. Além disso, foi verificada formação de pigmentos com colorações e quantidades diferentes entre as três espécies. O pigmento produzido por *C. gattii*, a partir do D-triptofano, era diferente e não relacionado com a produção de melanina a partir de 3,4-dihidroxifenilalanina. Diante desses resultados, os autores sugeriram a possibilidade do uso dos meios m-DTDP e YCB-DTDP para diferenciar *C. neoformans* e *C. gattii*.

Nos processos de melanização em *C. neoformans* diferentes substratos podem ser utilizados. As catecolaminas vem sendo empregadas para melhor compreensão e estudo deste

processo e sua relação com a virulência (KWON-CHUNG; RHODES, 1986; POLACHECK; PLATT; ARONOVITCH, 1990; JACOBSON; EMERY, 1991; IKEDA et al., 2002; FRASES et al., 2006; CHASKES et al., 2008).

Ainda com base no uso das catecolaminas Garcia-Rivera e colaboradores (2005) realizaram estudo comparativo das melaninas produzidas por *C. neoformans* utilizando como substratos L-dopa, epinefrina, norepinefrina e metildopa, incubados por 11 dias com as leveduras para determinar se os pigmentos formados eram melanina e a influência dos mesmos nas características das células pigmentadas. Os resultados mostraram que as amostras de *C. neoformans* incubadas com L-dopa e metildopa apresentaram partículas de melanina de maior espessura, as partículas originadas das amostras incubadas com epinefrina não cumpriram todos os critérios para serem consideradas melaninas e o cultivo de *C. neoformans* com estes substratos produziram células e cápsulas com tamanho diferentes.

Eisenman e colaboradores (2007) mostraram que a levedura apresenta pouca esteraseletividade para 3,4-dihidroxifenilalanina (dopa), pois além de empregar L-dopa como substrato na melanização é capaz de utilizar D-dopa.

Na busca de informações sobre o comportamento do fungo quanto à melanização, diversos trabalhos têm sido realizados tanto com amostras de origens clínicas quanto ambientais de *C. neoformans* (MACHADO; AMARAL; SEVERO, 1993; SORRELL et al., 1996; BARÓ et al., 1999; CASTAÑÓN-OLIVARES et al., 2000; BARONI, 2001; VIVIANI et al., 2003; DIAS, 2006b; PEDROSO et al., 2007). Adicionalmente, realizou-se testes com amostras de *C. neoformans* de origens clínicas e ambientais cultivadas em meio sólido com L-dopa conforme Baroni (2001), sob diferentes condições de pH e temperaturas de incubação.

Em 10 amostras estudadas e o padrão ATCC 90112 de *C. neoformans* não foi observado comportamento uniforme de melanização sob diferentes pH (5,0; 6,0 e 7,0) e distintas temperaturas (25 °C, 30 °C, 35 °C) analisadas. Dentre as amostras estudadas, sete apresentaram redução da melanização, principalmente, sob pH 7,0 e à temperatura de 35 °C.

A amostra B 96 mostrou redução da melanização sob pH 6,0 e 7,0 e sob temperaturas de 30 °C e 35 °C. A amostra ICB 88 apresentou redução da melanização a 30 °C e 35 °C e teve crescimento inibido a 35 °C, inibição esta observada também na amostra ICB 189 a 35°C sob pH 5,0 e 7,0.

A amostra ICB 155 não apresentou nenhuma variação na melanização com a variação dos pH e temperaturas estudados.

A amostra ICB 178 apresentou leve redução da melanização apenas sob temperatura de 35 °C em meio com os três pH analisados. *C. neoformans* ATCC 90112 de apresentou

maior melanização a 25 °C e sob pH 5,0 e 6,0; em pH 7,0 houve redução na melanização sob todas as temperaturas analisadas.

Em geral, as amostras de origem clínica e o padrão ATCC 90112 apresentaram redução da melanização principalmente a 35 °C. As amostras cresceram bem a 25 °C e 30 °C sendo observada inibição do crescimento de algumas amostras a 35 °C (temperatura mais elevada). Esta observação revelou que algumas amostras apresentaram fenótipo de baixa tolerância a temperaturas relativamente elevadas (entre 37 °C e 39 °C) (CASADEVALL; PERFECT, 1998). O efeito de “proteção” da melanina às condições de temperaturas extremas não foi observado, pois as leveduras não foram previamente melanizadas, mas sim submetidas à melanização sob diferentes condições de temperatura e pH que podem ter interferido na produção da melanina (ROSAS; CASADEVALL, 1997).

Apesar do pH 7,0 ser melhor para a estabilidade da lacase (JUNG; XU; LI, 2002) as amostras estudadas apresentaram bom crescimento e melanização nos pH 5,0 e 6,0 e sob 25°C. A redução da melanização em pH 7,0 e sob 35 °C das amostras de *C. neoformans*, a princípio, não pode ser atribuída à inibição da lacase na presença de glicose, uma vez que a concentração desta no meio era de aproximadamente 0,5 %, cujo valor é próximo ao teor utilizado no trabalho de Canelo e Casquero (2000) que obteve boa atividade enzimática para lacase na presença de glicose 0,1 % (POLACHECK; HEARING; KWON-CHUNG, 1982; IKEDA; JACOBSON, 1992; WILLIAMSON, 1994).

Outras justificativas para redução da melanização a 35 °C podem ser a autooxidação que ocorre com a L-dopa em temperaturas próximas a 37 °C e a redução da atividade enzimática da lacase em temperaturas próximas a 37 °C (IKEDA; JACOBSON, 1992; CANELO; CASQUERO, 2000).

## 7.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MELANINA POR MEIO DA ELETROFORESE EM GEL PAGE NÃO-DESNATURANTE

A produção de lacase em *C. neoformans*, por estar intimamente ligada à melanização e conseqüentemente aos fatores associados à virulência, torna-se alvo de investigação para melhor compreensão das diferentes quantidades de melanina produzida por amostras envolvidas em infecções e isoladas do ambiente (CASADEVALL; PERFECT, 1998).

As amostras, após incubação em meio com L-dopa por 48 h sob agitação orbital a 150 rpm, foram rompidas para liberação da lacase, pelo fato de *C. neoformans* apresentar duas isoformas da enzima (uma ligada à parede celular e outra ao citoplasma) conforme descrito por Missall e colaboradores (2005).

O crescimento sob agitação justifica-se pelos trabalhos de Odds (1995) e Ohkusu (2001) que comprovaram a necessidade de oxigenação para melhor crescimento das amostras, e neste trabalho, tanto o crescimento quanto a quantidade de lacase determinada e, conseqüentemente, a melanização das células também se encontraram aumentados.

A eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante foi realizada com as amostras e o padrão ATCC 90112 de *C. neoformans* (Figuras 6.10 a 6.16). A comprovação de que a lacase produziria melanina após eletroforese na presença de L-dopa foi verificada pela utilização da lacase padrão de *Rhus vernificera* Sigma<sup>®</sup>, que após incubação em tampão de revelação originou no gel três bandas de melanina com diferentes intensidade (Figura 6.17), estando a banda 3 em altura semelhante a maioria das bandas formadas pela lacase das amostras estudadas de *C. neoformans*.

Esta metodologia também foi aplicada no estudo da lacase nos trabalhos de Ikeda e colaboradores na caracterização da lacase de *C. neoformans* (1993) e em 2002 na avaliação da produção da enzima por diferentes espécies de *Cryptococcus* de importância clínica, no qual encontraram diferença de migração no gel de lacases de *C. albidus*, *C. laurentii* e *C. curvatus*. Os autores também observaram a formação de mais de uma banda de melanina no gel para uma única amostra de *C. curvatus*.

A revelação dos géis foi realizada em tampão ácido cítrico-fosfato de sódio pH 6,0 para conferir maior estabilidade à lacase, conforme descrito por Jung; Xu e Li, 2002.

Nesta dissertação trabalho avaliou-se a aplicabilidade da eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante na investigação da lacase através da obtenção do pigmento melanínico produzido por diferentes amostras de *C. neoformans*. Esta mostrou-se uma ferramenta útil permitindo a obtenção de bons resultados após padronização dos procedimentos.

A quantificação da intensidade da banda de melanina, obtida nos géis, foi realizada por densitometria e, a partir desta, foram calculadas as proporções de melanina.

Analisando as intensidades das bandas de melanina apresentadas pelas amostras (GRÁFICOS 6.1 e 6.2), 60,0 % das amostras ambientais apresentaram intensidade de melanina acima de 60 pontos, contra 31,25 % das amostras clínicas. O padrão ATCC 90112 de *C. neoformans* apresentou resultado abaixo de 60 pontos.

Organizando as proporções de melanina em intervalos de intensidade (Quadro 6.1) os maiores resultados (faixa entre 20-60 vezes) foram apresentados pelas amostras ambientais (53,33 %) contra 31,25 % das amostras clínicas.

As amostras de origem ambiental apresentaram o menor valor de intensidade (amostra ICB 187) e os maiores valores de intensidade com 64,29% das amostras acima de 60 pontos contra 35,71 % das amostras clínicas. Esta distribuição variada e os maiores valores de intensidades de melanina podem ser atribuídos a exposição prévia às condições adversas do meio ambiente antes do isolamento como calor, luz, raios UV (PLONKA; GRABACKA, 2006).

O surgimento de duas bandas de melanina na amostra clínica ICB 88 indica a produção de isoenzimas da lacase em *C. neoformans*, conforme descrito também por Ikeda e colaboradores (2002) em *C. curvatus*. A presença de isoformas da enzima, em algumas amostras, sugere que o processo de melanização em *C. neoformans* apresenta alta eficiência e pode estar relacionado com a diversidade de substratos encontrados em a natureza (PUKKILA-WORLEY et al., 2005).

As menores intensidades de melanina encontradas nas amostras de origem clínica podem estar relacionadas com o fato da expressão da lacase com produção de melanina não serem as únicas estratégias da levedura para burlar o sistema imune do hospedeiro; uma vez que dispõe de outros fatores associados à virulência que contribuem em conjunto para sobrevivência do patógeno (RETINI et al., 1998; CHIAPELLO et al., 2001; STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003; ZARAGOZA; FRIES; CASADEVALL, 2003).

### 7.3 SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

As considerações sobre os resultados obtidos nos testes estão descritos a seguir.

#### 7.3.1 Obtenção das partículas de melanina e tindalização parcial

As partículas de melanina após extração apresentaram formatos entre esférico a oval de cor marrom a negra, semelhantes ao observado por Rosas e colaboradores (2000) e Garcia-Rivera e colaboradores (2005).

A tindalização parcial foi considerada processo de esterilização, nas condições do experimento, pois após sucessivas inoculações em caldo BHI não houve crescimento de contaminantes conforme observado no controle positivo.

#### 7.3.2 Método de difusão em agar a partir de disco com e sem adição de melanina

Os testes foram realizados segundo documento M44-A (CLSI, 2004) com e sem adição de melanina.

O meio de cultura agar Müller-Hinton foi suplementado com glicose para melhor crescimento das amostras e com azul de metileno em baixa concentração para ajudar na observação dos halos de inibição.

Pfaller e colaboradores (1998) observaram pouco crescimento de *C. neoformans* e *Candida* spp., em agar Müller-Hinton, em teste de sensibilidade ao fluconazol, porém, em trabalho posterior Pfaller e colaboradores (2004) com meio suplementado com glicose a 2 %, permitiu o crescimento de *C. neoformans*. O azul de metileno facilitou a leitura dos halos de inibição na metodologia de difusão em agar a partir de discos com fluconazol, conforme recomendado no método de referência M44 (CLSI, 2004).

Os padrões de *Candida* spp. apresentaram resultados de sensibilidade para o fluconazol, na metodologia de difusão em agar a partir de disco, conforme proposto no

documento M44-A (CLSI, 2004) e no estudo de Barry e colaboradores (2003). Para anfotericina B, os padrões apresentaram perfil de sensibilidade conforme critérios propostos pelo fabricante (CECON<sup>®</sup>) com halos de inibição maiores que 10 mm. A comparação com resultados de outros pesquisadores não foi possível devido a inexistência de trabalhos utilizando discos com 100 µg de anfotericina B, mas sim trabalho com discos de 10 µg de anfotericina B (ESPINEL-INGROFF, 2006).

As amostras de *C. neoformans* frente ao fluconazol apresentaram crescimento de microcolônias dentro do halo de inibição, próximo às bordas e as mesmas foram ignoradas na leitura tanto sem quanto com adição de partículas de melanina conforme documento M44-A (CLSI, 2004). Tal fenômeno, chamado de ‘trailing’ ou crescimento residual, não está relacionado à resistência da levedura, mas pode ser atribuído ao efeito fungistático do fluconazol que, ao bloquear a síntese de ergosterol, não impede que a mesma continue crescendo por utilizar o ergosterol armazenado na célula.

O crescimento de microcolônias em testes de sensibilidade aos antifúngicos azólicos foi estudado por Pfaller e colaboradores (1998). Eles verificaram que os meios RPMI 1640 suplementado com 2 % de glicose e agar Casitone minimizaram o crescimento residual e facilitaram a leitura dos teste de sensibilidade com *Candida* spp. e *C. neoformans*.

Barry e colaboradores (2002) em testes de sensibilidade ao fluconazol frente à espécies de *Candida* mostraram que o agar Müller-Hinton, quando suplementado com glicose a 2 %, favoreceu o crescimento das leveduras e o azul de metileno a 0,5 µg/mL promoveu melhor definição do halo de inibição, que pode estar relacionado à ação antimicrobiana do mesmo sobre as microcolônias que cresceriam na presença do fluconazol.

As taxa de amostras de *C. neoformans* sensíveis ao fluconazol após 48 h de incubação foi de 54,6 %; após 72 h a taxa de sensibilidade reduziu para 18,2 %. A redução da taxa de sensibilidade pode estar relacionada com o efeito trailing que aumenta com o passar do tempo. Este resultado discorda do trabalho de Pfaller e colaboradores (2004) que encontraram 93,8 % de amostras sensíveis ao fluconazol empregando a mesma metodologia.

Para a anfotericina B todas as amostras de *C. neoformans* foram sensíveis após 48 h ou 72 h de incubação. Ao contrário do fluconazol, não foram observados crescimento de microcolônias que indicaria resistência ao polieno fungicida. Não foram encontrados, na revisão de literatura, trabalhos de sensibilidade ao fluconazol e anfotericina B em relação a leituras a 48 h e 72 h de incubação, com amostras de *Cryptococcus* spp.

Com a superfície melanizada, as amostras sensíveis ao fluconazol corresponderam a 40,0 % e 36,4 % após 48 h e 72 h, respectivamente, contra 54,6 % e 18,2 % com adição de

melanina. Houve redução da taxa de sensibilidade frente ao fluconazol tanto com ou sem adição de melanina após 72 h. A diferença entre as taxas a 48 h de incubação pode estar relacionada às características inerentes à levedura e a adição de melanina na superfície do meio. A maior redução da taxa de sensibilidade no teste sem adição de melanina pode estar relacionada ao efeito trailling e a habilidade de crescimento das leveduras, que não sofreram interferência da adição das partículas de melanina.

Não foi possível estabelecer tendência a perfil de S ou R entre as amostras de origem clínica e ambiental de *C. neoformans*, após adição de melanina, através dos tamanhos dos halos de inibição, tanto a 48 h quanto a 72 h de incubação. E isto, pode estar relacionado ao pequeno número de amostras avaliadas, às características inerentes às células e também ao fato da melanina não absorver e nem proteger a levedura contra o fluconazol conforme descrito por Ikeda e colaboradores (2003).

Na presença da anfotericina B, as amostras clínicas e ambientais de *C. neoformans*, após adição de melanina, não apresentaram comportamento uniforme de tamanho dos halos de inibição, pois foram observados tanto aumento quanto redução dos mesmos entre as amostras de mesma origem, sendo observado a 48 h, para amostras clínicas 50 % de redução e aumento dos halos; e para as amostras ambientais 60 % de aumento e 40 % de redução dos halos. Tais discrepâncias podem estar relacionadas com as condições dos testes, que influenciaram sobremaneira na formação dos halos, e consequentemente, nos resultados.

Uma segunda justificativa para discordância poderia ser o tempo de cultivo na presença de L-dopa 1 mM para melanização das amostras de *C. neoformans*, porém Van Duin; Casadevall; Nosanchuk (2002) e Ikeda e colaboradores (2003) cultivaram *C. neoformans* por 10 dias e observaram efeito de proteção da melanina contra anfotericina B. Além disso, Wang; Casadevall (1994b) observaram resistência à anfotericina B em células de *C. neoformans* a partir do primeiro dia de melanização, confirmando que as amostras utilizadas neste trabalho foram incubadas por tempo suficiente para obtenção de partículas melanizadas com capacidade de completar com a anfotericina B.

Pode-se supor, portanto, que as amostras apresentaram capacidades distintas de melanização e, desse modo, a complicação com a droga foi influenciada por este fator.

### 7.3.3 Método de difusão em agar a partir de fita (E-test®) com e sem adição de melanina

A utilização do meio Mueller-Hinton suplementado com 2 % de glicose e 0,5 µg/mL de azul de metileno na metodologia de difusão em agar por meio de fita (E-test®) foi avaliado pela primeira vez por Pfaller e colaboradores (2004). Os antifúngicos avaliados foram fluconazol, voriconazol e anfotericina B frente a espécies de *Candida* e resultados satisfatórios foram obtidos para anfotericina B.

As amostras analisadas em nosso trabalho apresentaram crescimento de microcolônias na presença do fluconazol, apesar da utilização do azul de metileno, próximo às bordas da zona de inibição como também foi observado nos trabalhos de Colombo e colaboradores (1995), Caem e colaboradores (1996), Espinel-Ingroff e colaboradores (1996) e Aller e colaboradores (2000b).

A adição de partículas de melanina não impediu ou pareceu favorecer o crescimento de microcolônias frente ao fluconazol, fato que tem justificativa semelhante à descrita na metodologia de difusão em agar a partir de disco. A minimização do crescimento residual pela incorporação de azul de metileno ao meio também foi descrita por Cancun e colaboradores (2006) para espécies de *Candida* e *C. neoformans* frente ao E-test®.

A sensibilidade das amostras de *C. neoformans* para o fluconazol segundo os critérios propostos no documento M27-A2 (CLSI, 2002) e de Aller e colaboradores (2000a), após 48 h de incubação foi de 45,4 % e após 72 h reduziu para 27,3 %. As amostras com perfil sensível dose-dependente foram de 27,3 % e 18,2 % para os tempos de incubação de 48 h e 72 h, respectivamente. As taxas de amostras resistentes foram de 27,3 % e 54,6 % a 48 h e 72 h, respectivamente. Estes perfis de sensibilidade discrepantes nas leituras a 48 h e 72 h, mostra que a leitura após 72 h pode levar a erro na classificação de amostras sensíveis que seriam consideradas sensível dose-dependente e/ou resistente, fato já relatado por outros autores, e atribuído ao efeito trailing em estudos com *Candida* spp., mas ainda pouco observado em testes com *Cryptococcus* spp.

As amostras de *C. neoformans* foram sensíveis à anfotericina B embora tenha sido observado aumento das CIMs na leitura após 72 h de incubação. Não foi encontrado na revisão de literatura trabalhos que comparem os resultados das CIMs para anfotericina B após 48 h e 72 h de incubação para *C. neoformans*.

Comparações entre valores de CIM 50 e 90 obtidos após diferentes tempos de incubação (24 h e 48 h) frente a 400 espécies de *Candida* foram realizados por Matar e

colaboradores (2003) e 46,25 % das amostras apresentaram aumento das CIMs 50 e 90 nas leituras após 48 h de incubação.

Em conformidade com o trabalho de Maxweel e colaboradores (2003) não foi encontrada nenhuma amostra resistente à anfotericina B após 48 h e 72 h de incubação, com e sem adição de melanina sob critério de CIM > 1,0 µg/mL para resistência.

Para o fluconazol, a faixa de CIM das nossas amostras após 72 h de incubação (1,5 µg/mL - 128 µg/mL) foi mais ampla que a faixa encontrada por Warnock, Johnson e Rogers (1998) que foi de 6,0 µg/mL - 64 µg/mL, porém foi mais estreita que as faixas encontradas por Aller e colaboradores em meio RPMI (2000b), Baroni (2001) e Dias (2006b) que foram de 0,5 µg/mL ≥ 256 µg/mL, 0,38 µg/mL - 96 µg/mL e 0,094 µg/mL ≥ 64 µg/mL, respectivamente.

As CIMs 50 e 90 para o fluconazol encontradas (48 e 96 µg/mL) foram bem superiores às encontradas por Dias (2006b) que foram de 6 µg/mL e 32 µg/mL e por Aller e colaboradores (2000b) em meio RPMI (2 µg/mL e 12 µg/mL). Outras comparações com resultados de CIM 50 e 90 não foram possíveis, diante da inexistência de trabalhos com *C. neoformans* frente ao fluconazol, verificada na revisão de literatura.

E, ainda, com relação ao fluconazol foram encontrados resultados de CIM entre 8 µg/mL - 16 µg/mL (12 µg/mL) e 32 µg/mL - 64 µg/mL (48 µg/mL) que foram classificados como resistente se CIM ≥ 16 µg/mL conforme Aller e colaboradores (2000a).

Para anfotericina B a faixa de CIM das amostras de *C. neoformans* (0,006-0,19 µg/mL) teve valores semelhantes aos encontrados nos trabalhos de Warnock, Johnson e Rogers (1998) entre 0,023-0,25 µg/mL; Maxwell e colaboradores (2003) entre 0,015-1,0 µg/mL e Dias (2006b) entre 0,008- 0,032 µg/mL, porém foram inferiores aos resultados de Baroni (2001) entre 0,19-6,0 µg/mL.

A CIM 50 das amostras deste trabalho para anfotericina B (0,094 µg/mL) ficou abaixo dos valores encontrados por Maxwell e colaboradores (2003) que foi de 0,5 µg/mL; e superior ao valor encontrado por Dias (2006b) que foi de 0,008 µg/mL. A CIM 90 calculada para as amostras deste trabalho, frente à anfotericina B (0,19 µg/mL) foi menor que o valor encontrado por Maxwell e colaboradores (2003) (1,0 µg/mL); e maior que o valor encontrado por Dias (2006b) (0,032 µg/mL). As diferenças entre as faixas de CIMs, CIMs 50 e 90 das amostras deste trabalho e as de trabalhos citados, anteriormente, podem estar relacionadas com a exposição prévia das amostras à antimicrobianos, mutações e/ou condições de manutenção diferente das amostras.

As amostras de *C. neoformans* com adição de melanina, frente ao fluconazol, após 48 h de incubação apresentaram taxa de sensibilidade de 50 % e de 50 % para resistência. Após

72 h houve redução da sensibilidade de 50 % para 18,2 %. A porcentagem de amostras S-DD aumentou de zero a 48 h para 27,3 % a 72 h e a de R aumentou de 50 % a 48 h para 54,6 % a 72 h, após mesmos períodos de incubação.

Para o fluconazol, a CIM 50, com adição de melanina após 48 h (8 µg/mL) e 72 h (48 µg/mL); e a CIM 90, com adição de melanina, após 48 h (96 µg/mL) e 72 h (192 µg/mL) foram próximos às CIMs sem adição de melanina (CIM 50 e 90, a 48 h, de 12 µg/mL e 96 µg/mL; e a 72 h, de 48 µg/mL e 96 µg/mL, respectivamente), demonstrando que a adição de melanina não modificou o perfil de sensibilidade frente ao fluconazol e anfotericina B. Para anfotericina B as amostras de *C. neoformans* nas leituras a 48 h e 72 h, porém, foi observado aumento nos valores das CIMs para maioria das amostras (90,9 %), exceto para amostra ICB 95 que apresentou crescimento lento após adição de melanina.

Os aumentos dos valores de CIM das amostras frente à anfotericina B após adição de melanina podem estar relacionados com o efeito de proteção da levedura pela melanina que foram descritos por Wang; Casadevall (1994b), Casadevall e Perfect (1998), Gómez e Nosanchuk (2003) e Ikeda e colaboradores (2003).

As diferenças encontradas entre as faixas de CIM e as CIMs 50 e 90 dos testes de sensibilidade, com e sem adição de melanina, frente ao fluconazol e anfotericina B podem estar relacionadas com a exposição prévia das amostras à antimicrobianos, mutações e/ou condições de manutenção diferente das amostras.

Comparando os valores de CIMs entre as amostras de *C. neoformans* com e sem adição de melanina e nos tempos de incubação de 48 h e 72 h, obtivemos como resultado para o fluconazol, 2 e 3 amostras apresentando CIMs > que 2 diluições após 48 h e 72 h de incubação, respectivamente. Para anfotericina B, após 48 h e 72 h de incubação temos 4 e 5 amostras com CIMs > 2 diluições, respectivamente.

Considerando o critério de equivalência entre CIMs, estabelecido para *Candida* spp. por Cuenca-Estrella e colaboradores (2005), os resultados de CIMs com variação superior a 2 diluições são considerados discordantes ou não-equivalentes, portanto nos testes frente ao fluconazol e à anfotericina B foram encontradas, após 48 h, 20,0 % e 40,0 % das amostras com resultados de CIMs discordantes, respectivamente; e após 72 h, as taxas foram de 27,3 % para o fluconazol e de 45,4 % para anfotericina B. Estes podem ter origem na interação das partículas de melanina com as leveduras, pela exposição prévia à droga ou então devido a características fenotípicas das amostras.

Os resultados de CIM, CIM 50 e 90 das nossas amostras para anfotericina B, com e sem adição de melanina com aumento de CIM superior a 2 diluições, tanto após 48 h e 72 h

de incubação, sugerem que houve interferência da melanina na sensibilidade das amostras o que justifica-se pelo efeito de proteção da melanina mencionado anteriormente.

#### 7.3.4 Considerações finais

A melanização das amostras de *C. neoformans* nos testes sob diferentes condições de cultivo nos pH 5, 6 e 7 e temperaturas de 25 °C, 30 °C e 35 °C, pareceu ser influenciada principalmente pela temperatura de 35 °C, sendo observadas as maiores interferências da melanização em meio sólido nas condições dos testes sob pH 5,0 e a 35 °C.

A técnica de eletroforese em gel PAGE não-desnaturante mostrou-se uma ferramenta útil que permitiu a avaliação da lacase de amostras de diferentes origens de *C. neoformans*, através da formação de bandas de melanina no gel. As amostras apresentaram grande variação de intensidades de melanina, sendo os maiores valores encontrados entre as de origem ambiental frente às amostras de origem clínica estudadas.

A interferência da melanina sobre a anfotericina B, quando adicionada na superfície dos meios de cultura em testes de sensibilidade, necessita de posteriores estudos realizados com diferentes concentrações e com número maior de amostras de origem clínica e ambiental de *C. neoformans*.

A melanina, em todos os testes de sensibilidade das amostras de *C. neoformans* para o fluconazol pareceu não modificar a sensibilidade, mesmo com leituras 48 h e 72 h, porém foram observadas diferenças na habilidade de crescimento das leveduras, principalmente da amostra ICB 95 após adição das mesmas.

A formação de 'trailing' foi observada como nos testes realizados sem adição da melanina frente aos fluconazol, porém as leveduras pareceram crescer mais lentamente.

Para anfotericina B, a melanina não modificou o perfil de sensibilidade das amostras nos tempos de incubação de 48 h e 72 h, porém aumento considerável nas CIMs ( maior que 2 diluições), foram observadas em 40,0 % e 45,4 % das amostras a 48 h e 72 h, respectivamente, e necessita de estudos adicionais para confirmação de interação entre a droga e as leveduras nas condições de cultivo utilizadas.

Para as amostras de *C. neoformans* não foi possível estabelecer relação entre as maiores intensidades de melanina com os valores de CIMs obtidos nos testes com e sem adição de melanina, através da metodologia de difusão em agar a partir de fita (E-test®).

## 8 CONCLUSÕES

- ✓ A melanização das amostras e do padrão ATCC 90112 de *C. neoformans* não apresentou comportamento uniforme entre as amostras de diferentes origens.
- ✓ As maiores reduções de pigmentação e crescimento das leveduras foram observadas sob condições de pH 7,0 e incubação à temperatura de 35 °C.
- ✓ Todas as amostras, clínicas e ambientais, de *C. neoformans* cresceram nos meios com pH 5,0 e 6,0 na temperatura de 25 °C.
- ✓ A técnica de eletroforese em gel PAGE não-desnaturante mostrou-se ferramenta útil na análise da lacase produzida por diferentes amostras de *C. neoformans*, seguida de posterior quantificação de melanina por densitometria das bandas após reação com L-dopa.
- ✓ As amostras ambientais de *C. neoformans* (64,29 %) apresentaram os maiores valores de intensidade de melanina com ampla faixa de variação.
- ✓ Mais da metade das amostras clínicas (56,2 %) e o padrão ATCC 90112 de *C. neoformans* apresentaram as intensidades de melanina mais baixas, sendo que, uma amostra mostrou duas bandas de melanina no gel, indicando a presença de isoformas da lacase.
- ✓ Os testes de sensibilidade aos antifúngicos fluconazol e anfotericina B, através das metodologias de difusão em agar por disco e fita (E-test<sup>®</sup>), mostraram que a leitura após 72 h de incubação pode levar a erro na classificação quanto ao perfil de sensibilidade, tanto nos testes com ou sem adição de melanina.
- ✓ A adição de melanina na superfície dos meios de cultura nos testes de sensibilidade pareceu não interferir nos resultados frente ao fluconazol nas metodologias de difusão em agar a partir de disco e fita (E-test<sup>®</sup>).

- ✓ Para anfotericina B houve aumento de CIMs para 90,9 % das amostras, sendo 45,4% superior a 2 diluições com adição de melanina nos testes de sensibilidade na metodologia de difusão em agar a partir de fita (E-test<sup>®</sup>).
- ✓ Estudos adicionais com maior número de amostras clínicas e ambientais de *C. neoformans* faz-se necessário para conclusões sobre a interferência da melanina no perfil de sensibilidade das amostras.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKOH, C. C. et al. GDSL family of serine esterase/lipase. **Progress in Lipid Research**, v. 43, n. 6, p. 534-552, 2004.

ALEXANDER, R. R.; GRIFFITHS, J. M. **Basic Biochemical Methods**. 2. ed. New York: Wiley-Liss, 1993.

ALLER, A. I. et al. Correlation of fluconazole MICs with clinical outcome in Cryptococcal infection. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 6, p. 1544-1548, 2000a.

ALLER, A. I. et al. Comparison of the Etest and microdilution method for antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* to four antifungal agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, p. 997-1000, 2000b.

BARBOSA, A. T. F. et al. Isolated pulmonary criptococosis in an immunocompetent patient. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 5, p. 476-480, 2006.

BARCHIESI, F. et al. Activity of the new antifungal triazole, posaconazole, against *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 769-773, 2001.

BARKER, R. D. The primary pulmonary lymph node complex of cryptococcosis. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 65, n. 1, p. 83-92, 1976.

BARÓ, T. et al. Estudio de muestras de polvo doméstico para el aislamiento ambiental de *Cryptococcus neoformans*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 15, p. 309, 1999.

BARONI, F. A. et al. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro city, RJ, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 2, p. 71-75, Mar./Apr. 2006.

BARONI, F. A. et al. **Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos localizadas em torres de igrejas na cidade do Rio de Janeiro – fatores de virulência e sensibilidade aos antifúngicos**. 2001. 205f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2001.

BARRY, A. et al. Quality control limits for fluconazole disk susceptibility tests on Müller-Hinton agar with glucose and methylene blue. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 3410-3412, July 2003.

BARRY, A. et al. Precision and accuracy of fluconazole susceptibility testing by broth microdilution, Etest, and disk diffusion methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1781-1784, June 2002.

BEDOUT, C. de et al. *In vitro* antifungal susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and *C. neoformans* var. *gattii*. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.16, p. 36-39, 1999.

BELL, A. A.; WHEELER, M. H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. **Annual Reviews Phytopathology**, v. 24, p. 411-451, 1986.

BENNETT, J. E.; KWON-CHUG, K. J.; THEODORE, T. S. Biochemical differences between serotypes of *Cryptococcus neoformans*. **Sabouraudia**, v. 16, n. 3, p. 167-174, 1978.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 2, p. 159-172, jul./dez. 2004.

BLACKSTOCK, R. et al. Pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* is associated with quantitative differences in multiple virulence factors. **Mycopathology**, v.147, p.1-11, 1999.

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

BOLAÑOS, B.; MITCHELL, T. G. Killing of *Cryptococcus neoformans* by rat alveolar macrophages. **Medical Mycology**, v. 27, n. 4, p. 219-228, 1989.

BOSE, I. et al. A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 4, p. 655-663, Aug. 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, Jan. 1976.

BRAGA, F. G. et al. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 396-402, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas da Saúde. Coordenação Nacional de DST e Aids. **Recomendações para tratamento das principais doenças oportunistas em pacientes adolescentes e adultos infectados pelo HIV ou com Aids**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. Disponível em:

<[http://www.aids.gov.br/data/documents/storedDocuments/doencas\\_oportunistas.pdf](http://www.aids.gov.br/data/documents/storedDocuments/doencas_oportunistas.pdf)>

Acesso em: 09 maio 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Boletim Epidemiológico AIDS DST**, Ano IV, nº01, Jul. 2006/ Jul. 2007. Brasília, 2007. Disponível em:

<<http://www.aids.gov.br/data/documents/storedDocuments/Boletim2007>> Acesso em: 09 de maio 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 6. ed. Série B. Textos Básicos de Saúde. Brasília, 2006, p. 85-86.

Disponível em: <[http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_bolso\\_6ed.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_bolso_6ed.pdf)>. Acesso em: 09 de maio 2008.

BROUWER, A. E. et al. Combination antifungal therapies for HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomized trial. **The Lancet**, v. 363, p. 1767-1767, May 2004.

BRUESKE, C. H. Proteolytic activity of a clinical isolate of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 631-633, 1986.

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

BULMER, G. S.; SANS M. D. *Cryptococcus neoformans* III. Inhibition of phagocytosis. **Journal of Bacteriology**, v. 95, n. 1, p. 5-8, Jan. 1968.

BULMER, G. S.; SANS, M. D.; GUNN, C. M. *Cryptococcus neoformans* I. Nonencapsulated mutants. **Journal of Bacteriology**, v. 94, n. 5, p. 1475-1479, Nov. 1967.

CARBALLEIRA, N. M. New advances in fatty acids as antimalarial, antimycobacterial and antifungal agents. **Progress in Lipid Research**, v. 47, n. 1, p. 50-61, Jan. 2008.

CANELO, C. D.; CASQUERO, J. C. Fenoloxidasa modificada: clave para identificar cepas de *Cryptococcus neoformans*. **Revista de Medicina Experimental**, v. 17, n. 1-2, 2000.

CANTÓN, E. et al. Evaluación y utilidad de los métodos E-test® y Neo-Sensitabs® para estudiar la sensibilidad de las levaduras al fluconazol. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 19, n. 3, p. 267-274, Sept. 2006.

CASADEVALL, A. Fungal virulence, vertebrate endothermy, and dinosaur extinction: is there a connection? **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, p. 98-106, Nov. 2005.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. The damage-response framework of microbial pathogenesis. **Nature Review Microbiology**, v. 1, p. 17-24, Oct. 2003.

CASADEVALL, A.; STEENBERGEN, J. N.; NOSANCHUK, J. D. 'Ready made' virulence and 'dual use' virulence factors in pathogenic environmental fungi – the *Cryptococcus neoformans* paradigm. **Current Opinion in Microbiology**, v.6, p. 332-337, 2003.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, p. 337-344, June 2001.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 12, p. 6511-6518, Dec. 2000.

CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Current Opinion in Microbiology**, v.3, p. 354-358, 2000.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 8, p. 3703-3713, Aug. 1999.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*. Washington: ASM Press, 1998.

CASTAÑÓN-OLIVARES, L. R. et al. Frequency of *Cryptococcus* species and varieties in México and their comparison with some Latin American countries. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 42, p. 35-40, 2000.

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, Sept. 1999.

CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Isolation of the third capsule-associated gene, *CAP60*, required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 5, p. 2230-2236, May 1998.

CHANG, Y. C.; PENOYER, L. A.; KWON-CHUNG, K. J. The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans*, *CAP64*, is essential for virulence. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 6, p. 1977-1983, 1996.

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, July 1994.

CHASKES, S. et al. Growth and pigment production on D-tryptophan medium by *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*, and *Candida albicans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 255-264, Jan. 2008.

CHASKES, S.; TYNDALL, R. L. Pigment production by *Cryptococcus neoformans* and other *Cryptococcus* species from aminophenols and diaminobenzenes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 146-152, Feb. 1978.

CHASKES, S.; TYNDALL, R. L. Pigment production by *Cryptococcus neoformans* from para- and ortho-diphenols: effect of the nitrogen source. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 1, n. 6, p. 509-514, June 1975.

CHAYAKULKEEREE, M. et al. Fatty acid synthesis is essential for survival of *Cryptococcus neoformans* and a potential fungicidal target. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 10, p. 3537-3545, Oct. 2007.

CHEN, J. et al. *Cryptococcus neoformans* strains and infections in apparently immunocompetent patients, China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, p. 755-762, May 2008.

CHEN, S. C. A. et al. Identification of extracellular phospholipase B, lysophospholipase, and acyltransferase produced by *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 2, p. 405-411, Feb. 1997.

CHEN, S. C. A. et al. Antifungal susceptibility testing using the E-test: comparison with the broth macrodilution technique. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 37, p. 265-273, 1996.

CHEN, L.; BLANK, E. S.; CASADEVALL, A. Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 3, n. 5, p. 570-574, Sept. 1996.

CHERNIAK, R. et al. *Cryptococcus neoformans* chemotyping by quantitative analysis of <sup>1</sup>H NMR spectra of glucuronoxylomannans using a computer simulated artificial neural network. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5, p. 146-159, 1998.

CHERNIAK, R.; SUNDSTROM, J. B. Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 5, p. 1507-1512, 1994.

CHIAPELLO, L. et al. Mechanisms for induction of immunosuppression during experimental cryptococcosis: role of glucuronoxylomannan. **Clinical Immunology**, v. 100, n. 1, p. 96-106, July 2001.

CLEARE, W. et al. *In vitro* and *in vivo* stability of a *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan epitope that elicits protective antibodies. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 3096-3107, 1999.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved guideline M44-A**. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard-Second Edition. Document M 27-A2, v. 22, n.15**. Wayne: CLSI, 2002.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard-Second Edition. Document M 27-A, v. 17, n. 9**. Villanova: CLSI, 1997.

COLOMBO, A. L. et al. Comparison of Etest and nacional comittee for clinical laboratory standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibily testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 535-540, Mar. 1995.

COX, G. M. et al. Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting grow within macrophages. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 1, p. 173-180, Jan. 2003.

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.

CRUZ, M. C. S. et al. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 409-412, 2007.

CUENCA-ESTRELLA, M. A. et al. Correlation between the procedure for antifungal susceptibility testing for *Candida* spp. of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST) and four commercial techniques. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 6, p. 486-492, 2005.

DADACHOVA, E. et al. Ionizing radiation changes the electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi. **PLoS ONE** 2, v. 5, p. 1-13, May 2007.

DARZÉ C. et al. Características clínicas laboratoriais de 104 casos de meningoencefalite criptocócica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 1, p. 21-26, jan./fev. 2000.

Del POETA, M. Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 3, n. 5, p. 1067-1075, Oct. 2004.

Del POETA, M. et al. Topoisomerase I is essential in *Cryptococcus neoformans*: Role in pathobiology and as an antifungal target. **Genetics**, v. 152, p. 167-178, May 1999.

DIAMOND, R. D.; BENNETT, J. E. Growth of *Cryptococcus neoformans* within human macrophages *in vitro*. **Infection and Immunity**, v. 7, n. 2, p. 231-236, Feb. 1973.

DIAMOND, R. D.; ROOT, R. K.; BENNETT, J. E. Factors influencing killing of *Cryptococcus neoformans* by human leukocytes *in vitro*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 125, p. 367-376, 1972.

DIAS, A. L. T. et al. Superoxide dismutase in *Cryptococcus neoformans* varieties *gattii*, *grubii*, and *neoformans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 107-109, Feb. 2006a.

DIAS, A. L. T. **Diversidade fenotípica e genotípica de isolados ambientais e clínicos de *Cryptococcus neoformans*: sorotipos, “mating-types”, cariótipos, sensibilidade aos antifúngicos e isoenzimas superóxido dismutases**. 2006. 182f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006b.

DIAS, A. L. T. et al. Comparative analysis of Etest and broth microdilution method (AFST-EUCAST) for trends in antifungal drug susceptibility testing of Brazilian *Cryptococcus neoformans* isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1693-1699, Aug. 2006c.

DONG, Z. M.; MURPHY, J. W. Cryptococcal polysaccharides bind to CD18 on human neutrophils. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 2, p. 557-563, 1997.

DORSTHORST, D. T. A. et al. Relationship between *in vitro* activities of amphotericin B and flucytosine and pH for clinical yeast and mold isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3341-3346, Aug. 2005.

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

ESPINEL-INGROFF, A. Comparison of three commercial assays and a modified disk diffusion assay with two broth microdilution reference assays for testing *Zygomycetes*, *Aspergillus* spp., *Candida* spp., and *Cryptococcus neoformans* with posaconazole and amphotericin B. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 10, p. 3616-3622, Oct. 2006.

ESPINEL-INGROFF, A. International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibility of *Candida* spp. To fluconazole, itraconazole, posaconazole and voriconazole. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 3884-3889, Aug. 2005.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. Interlaboratory evaluation of Etest method for testing antifungal susceptibilities of pathogenic yeast to five antifungal agents by using casitone agar and solidified RPMI 1640 medium with 2 % glucose. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 848-852, 1996.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 12, p. 3138-3145, Dec. 1992.

EUCAST-SUBCOMMITTEE OF ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY TESTING OF THE EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY TESTING. METHOD FOR DETERMINATION OF MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATION (MIC) BY BROTH DILUTION OF FERMENTATIVE YEASTS. Taufkirchen, Germany: ECSMID, 2002. Discussion document E.Dis.7.1.

FERNANDES, O. de F. L. et al. *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com AIDS. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 1, p. 75-78, jan./fev. 2000.

FRANZOT, S. P.; SALKIN, I. F.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 832-840, 1999.

FRANZOT, S. P.; HAMDAN, J. S. *In vitro* susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* to five antifungal drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 3, p. 822-824, Mar. 1996.

FRASES, S. et al. *Cryptococcus neoformans* can utilize the bacterial melanin precursor homogentisic acid for fungal melanogenesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 2, p. 615-621, Jan. 2007.

FRASES, S. et al. Induction by *Klebsiella aerogenes* of a melanin-like pigment in *Cryptococcus neoformans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 2, p. 1542-1550, Feb. 2006.

GANENDREN, R. et al. *In vitro* antifungal activities of inhibitors of phospholipases from the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 5, p. 1561-1569, May 2004.

GARCIA-RIVERA, J. et al. Comparative analysis of *Cryptococcus neoformans* acid-resistant particles generated from pigmented cells grown in different laccase substrate. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, p. 989-998, Nov. 2005.

GARCIA-RIVERA, J.; CASADEVALL, A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* reduces its susceptibility to the antimicrobial effects of silver nitrate. **Medical Mycology**, v. 39, n. 4, p. 353-357, Aug. 2001.

GATES, M. A.; THORKILDSON, P.; KOZEL, T. R. Molecular architecture of the *Cryptococcus neoformans* capsule. **Molecular Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 13-24, 2004.

GÓMEZ, B. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and fungi. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 16, p. 91-96, 2003.

GRANGER, D. L.; PERFECT, J. R.; DURACK, D. T. Virulence of *Cryptococcus neoformans* regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 76, p. 508-516, Aug. 1985.

GREER, N. D. Posaconazole (Noxafil): a new triazole antifungal agent. **Baylor University Medical Center Proceedings**, v. 20, n. 2, p. 188-196, 2007.

HAMILTON, A. J.; HOLDOM, M. D. Antioxidant systems in the pathogenic fungi of man and their role in virulence. **Medical Mycology**, v. 37, n. 6, p. 375-389, Dec. 1999.

HAMILTON, A. J.; HOLDOM, M. D. Biochemical comparison of the Cu, Zn superoxide dismutases of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 2, p. 488-494, Feb. 1997.

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

HELLOU, S. et al. Criptococcosis respiratoria en pacientes VIH positivos. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 16, p. 126-129, 1999.

HOF, H. A new broad-spectrum azole antifungal: posaconazole-mechanisms of action and resistance, spectrum of activity. **Mycoses**, v. 49, p. 2-6, July 2006. Suppl. 1.

HOGAN, L. H.; KLEIN, B. S.; LEVITZ, S. M. Virulence factors of medically important fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 4, p. 469-488, Oct. 1996.

HUSAIN, S.; WAGENER M. M.; SINGH N. *Cryptococcus neoformans* infection in organ transplants recipients: variables influencing clinical characteristics and outcome. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 3, p. 375-381, May/June 2001.

IBRAHIM, A. S. et al. Adherence to and damage of endothelial cells by *Cryptococcus neoformans* in vitro: role of the capsule. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 11, p. 4368-4374, 1995.

IKEDA, R. et al. Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. **Microbiology and Immunology**, v. 47, n. 4, p. 271-277, July 2003.

IKEDA, R. et al. Laccase and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1214-1218, Apr. 2002.

IKEDA, R. et al. Characterization of phenol oxidase from *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. **Microbiology and Immunology**, v. 37, n. 10, p. 759-764, July 1993.

IKEDA, R.; JACOBSON, E. S. Heterogeneity of phenol oxidases in *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 9, p. 3552-3555, Sept. 1992.

IKEDA, R. et al. Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 22-29, July 1982.

JABBOUR, N. et al. Cryptococcal meningitis after liver transplantation. **Transplantation**, v. 61, n. 1, p. 146-149, Jan. 1996.

JACOBSON, E.S.; EMERY, H. S. Catecholamine uptake, melanization, and oxygen toxicity in *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 401-403, 1991.

JANBON, G. *Cryptococcus neoformans* capsule biosynthesis and regulation. **Federation of European Microbiological Societies Yeast Research**, v. 4, n. 8, p. 765-771, 2004.

JANBON, G. et al. Cas1p is a membrane protein necessary for the *O*-acetylation of the *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide. **Molecular Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 453-467, 2001.

JOHNSON M. D.; PERFECT J. R. Combination antifungal therapy: what can and should we expect? **Bone Marrow Transplantation**, v. 40, p. 297-306, June 2007.

JOHNSON, L. B.; KAUFFMAN, C. A. Voriconazole: a new triazole antifungal agent. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, p. 630-637, Feb. 2003.

JOSEPH-HORNE, T. et al. Cross-resistance to polyene and azole drugs in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, n.7, p. 1526-1529, July 1995.

JUNG, H.; XU, F.; LI, K. Purification and characterization of laccase from wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 161-168, 2002.

KELLY, S. L. et al. Resistance to amphotericin B associated with defective sterol  $\Delta 8 \rightarrow 7$  isomerase in a *Cryptococcus neoformans* strains from an AIDS patient. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, v. 122, p. 39-42, 1994.

KOKTURK, N. et al. Disseminated cryptococcosis in a human immunodeficiency virus-negative patient: a case report. **Mycoses**, v. 48, p. 270-274, 2005.

KOZEL, T. R. et al. Antigenic and biological characteristics of mutant strains of *Cryptococcus neoformans* lacking capsular *O*-acetylation or xylosyl side chains. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 5, p. 2868-2875, May 2003.

KOZEL, T. R. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. **Trends in Microbiology**, v. 3, n. 8, p. 295-299, Aug. 1995.

KOZEL, T. R. et al. Activation and binding of opsonic fragments of C3 on encapsulated *Cryptococcus neoformans* by using an alternative complement pathway reconstituted from six isolated proteins. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 7, p. 1922-1927, July 1989.

KOZEL, T. R. et al. Strain variation in phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*: dissociation of susceptibility to phagocytosis from activation and binding of opsonic fragments of C3. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 11, p. 2794-2800, Nov. 1988.

KOZEL, T. R.; HIGHISON, B.; STRATTON, C. J. Localization on encapsulated *Cryptococcus neoformans* of serum components opsonic for phagocytosis by macrophages and neutrophils. **Infection and Immunity**, v. 43, n. 2, p. 574-579, Feb. 1984.

KOZEL, T. R. Non-encapsulated variant of *Cryptococcus neoformans* II. Surface receptors for cryptococcal polysaccharide and their role in inhibition of phagocytosis by polysaccharide. **Infection and Immunity**, v. 16, n. 1, p. 99-106, Apr. 1977.

KOZEL, T. R.; MASTROIANNI, R. P. Inhibition of phagocytosis by cryptococcal polysaccharide: dissociation of the attachment and ingestion phases of phagocytosis. **Infection and Immunity**, v. 14, n. 1, p. 62-67, July 1976.

KWON-CHUNG, K. J. et al. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). **Taxon**, v. 51, p. 804-806, 2004.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Cryptococcosis. **Medical Micology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. p.398-399.

KWON-CHUNG, K. J.; EDMAN, J. C.; WICKES, B. L. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 2, p. 602-605, Feb. 1992.

KWON-CHUNG, K. J.; RHODES, J. C. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 51, n. 1, p. 218-223, Jan. 1986.

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

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHECK, I.; BENNETT, J. E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). **Journal of Clinical Microbiology**, v.15, n. 3, p. 535-537, 1982.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHECK, I.; POPKIN T. J. Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. **Journal of Bacteriology**, v. 150, n. 3, p. 1414-1421, June 1982.

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

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de micologia médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LANGFELDER, K. et al. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 38, p. 143-158, 2003.

LARSEN, R. A. et al. Correspondence of *in vitro* and *in vivo* fluconazole dose-response curves for *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.8, p. 3297-3301, Aug. 2005.

LARSEN, R. A. et al. Amphotericin B and fluconazole, a potent combination therapy for Cryptococcal meningitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n.3, p. 985-991, Mar. 2004.

LATOUCHE, G. N.; SORRELL, T. C.; MEYER, W. Isolation and characterization of the phospholipase B gene of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Federation of European Microbiological Societies Yeast Research**, v. 2, p. 551-561, July 2002.

LEVITZ, S. M.; FARRELL, T. P. Growth inhibition of *Cryptococcus neoformans* by cultured human monocytes: role of the capsule, opsonins, the culture surface, and cytokines. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 5, p. 1201-1209, May 1990.

LEVITZ, S. M.; DiBENEDETTO, D. J. Paradoxical role of capsule in murine bronchoalveolar macrophage-mediated killing of *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of Immunology**, v. 124, n. 2, p. 659-665, 1989.

LIAN, T. et al. Iron-regulated transcription and capsule formation in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 1452-1472, 2005.

LIMA, I. O. et al. Inhibitory effect of some phytochemicals in the growth of yeasts potentially causing opportunistic infections. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, Abr./Jun. 2005.

LITVINTSEVA, A. P. et al. Prevalence of clinical isolates of *Cryptococcus gattii* serotype C among patients with AIDS in sub-Saharan Africa. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, p. 888-892, Sept. 2005.

LIU, L.; TEWARI, R. P.; WILLIAMSON, P. R. Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. **Infection and Immunity**, v. 67, n.11, p. 6034-6039, Nov. 1999.

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, Oct. 1998.

MACHADO, C. C.; AMARAL, A. A.; SEVERO, L. C. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* isolado do solo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, n. 1, p. 77-79, jan./fev. 1993.

MANDAL, P. et al., Differences in the cell wall architecture of melanin lacking and melanin producing *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from India: an electron microscopy study. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 662-666, 2007.

McFADDEN, D.; ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A. The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 11, p. 497-505, Sep. 2006.

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

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 5, p. 449-460, 2006.

MATAR, M. J. et al. Correlation between E-test, disk diffusion, and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.5, p. 1647-1651, May 2003.

MAXWELL, M. J. et al. Evaluation of Etest method for determining voriconazole and amphotericin B MICs for 162 clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 97-99, Jan. 2003.

MEDNICK, A. J. et al. Melanization of *Cryptococcus neoformans* affects lung inflammatory responses during cryptococcal infection. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 2012-2019, Apr. 2005.

MEREDITH, P. SARNA, T. The physical and chemical properties of eumelanin. **Pigment Cell Research**, v. 19, p. 572-594, 2006.

MESSER, S. A. et al. Evaluation of disk diffusion and Etest compared to broth microdilution for antifungal susceptibility testing of posaconazole against clinical isolates of filamentous fungi. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1322-1324, Apr. 2007.

MISSALL, T. A. et al. Distinct stress responses of two functional laccases in *Cryptococcus neoformans* are revealed in the absence of the thiol-specific antioxidant Tsa1. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 1, p. 202-208, Jan. 2005.

MITCHELL, D. H. et al. Cryptococcal disease of the CNS in immunocompetent hosts: influence of cryptococcal variety on clinical manifestations and outcome. **Clinical Infectious Diseases**, v. 20, n. 3, p. 611-616, 1995.

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. 515-548, Oct. 1995.

MORAES, E. M. P; PRÍMOLA, N. S.; HAMDAN, J. S. Antifungal susceptibility of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* to four antifungal drugs determined by two techniques. **Mycoses**, v. 46, p. 164-168, 2002.

MOREIRA, L. S. **Estudo da atividade de drogas antifúngicas através de curvas de crescimento de *Candida albicans* utilizando o sistema automatizado bio-cell tracer**. 2003. 71f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

MOYRAND, F. et al. Cas3p belongs to a seven-member family of capsule structure designer proteins. **Eukaryotic Cell**, v. 3, n. 6, p. 1513-1524, Dec. 2004.

MOYRAND, F. et al. Isolation and characterization of capsule structure mutant strain of *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 837-849, 2002.

MURPHY, J. W. Protective cell-mediated immunity against *Cryptococcus neoformans*. **Research in Immunology**, v. 149, n. 4-5, p. 373-386, May-June, 1998.

MYLONAKIS, E. et al. *Galleria mellonella* as model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Infection and Immunity**, v.73, n. 7, p. 3842-3850, July 2005.

NARASIPURA, S. D.; AULT, J. G. Characterization of Cu, Zn superoxide dismutase (SOD1) gene knock-out mutant of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: role in biology and virulence. **Molecular Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1681-1694, 2003.

NAZI, I. et al. Role of homoserine transacetylase as a new target for antifungal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, n.5, p. 1731-1736, May 2007.

NIELSEN, K. et al. Interaction between genetic background and the mating-type locus in *Cryptococcus neoformans* virulence potential. **Genetics**, v. 171, p. 975-983, Nov. 2005.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 11, p. 3519-3528, Nov. 2006.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 203-223, 2003.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Cellular charge of *Cryptococcus neoformans*: contributions from the capsular polysaccharide, melanin and monoclonal antibody binding. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 5, p. 1836-1841, 1997.

NURUDEEN, T.; AHEARN, D. G. Regulation of melanin production by *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 724-729, 1979.

ODDS, F. C. et al. Oxygen as limiting nutrient for growth of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 995-997, Apr. 1995.

OHKUSU, M.; RACLAVSKY, V.; TAKEO, K. Deficit in oxygen causes G<sub>2</sub> budding and unbudded G<sub>2</sub> arrest in *Cryptococcus neoformans*. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, v. 204, p. 29-32, Sept. 2001.

PASQUALOTTO, A. C.; DENNING, D. W. New and emerging treatments for fungal infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, p. i19-i30, 2008. Suppl. 1.

PASSOS, X. S. et al. Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 6, p. 623-627, nov./dez. 2002.

PEDROSO, R. S. et al. The isolation and characterization of virulence factors of *Cryptococcus* spp. from saprophytic in the city of Riberão Preto, São Paulo, Brazil. **Microbiological Research**, *in press* 2007.

PELCZAR Jr., J. M. et al. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 1997. 517p. v. 2.

PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. **Federation of European Microbiological Societies Yeast Research**, v. 6, p. 463-468, 2006.

PERFECT, J. R.; COX, G. M. Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Drug Resistance Updates**, v. 2, p. 259-269, 1999.

PFALLER, M.A. et al. Comparison of results of voriconazole disk diffusion testing for *Candida* species with results from a central reference laboratory in the artemis global antifungal surveillance program. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n. 10, p. 5208-5213, Oct. 2005a.

PFALLER, M. A. et al. Global trends in the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2163-2167, May 2005b.

PFALLER, M. A. et al. Evaluation of the E-test method using Mueller-Hinton agar with glucosa and methylene blue for determining amphotericin B MICs for 4,936 clinical isolates of *Candida* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 4977-4979, Nov. 2004.

PFALLER, M. A. Antifungal susceptibility testing: progress and future developments. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 4, p. 55-60, 2000.

PFALLER, M. A. et al. Evaluation of the Etest method for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeast isolates by using three different agar media. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 9, p. 2586-2589, Sept. 1998.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; BOLMSTRÖM, A. Evaluation of Etest for determining in vitro susceptibility of yeast isolates to amphotericin B. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 32, p. 223-227, Sept. 1998.

PLONKA, P. M.; GRABACKA, M. Melanin synthesis in microorganisms – biotechnological and medical aspects. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, n. 3, p. 429-443, 2006.

POLACHECK, I.; PLATT, Y.; ARONOVITCH, J. Catecholamines and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 9, p. 2919-2922, Sept. 1990.

POLACHECK, I.; KWON-CHUNG, K. J. Melanogenesis in *Cryptococcus neoformans*. **Journal of General Microbiology**, v. 134, n. 4, p. 1037-1041, 1988.

POLACHECK, I.; HEARING, V. J.; KWON-CHUNG, K. J. Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Bacteriology**, v. 150, n. 3, p. 1212-1220, June 1982.

PUKKILA-WORLEY, R. et al. Transcriptional network of multiple capsule and melanin genes governed by the *Cryptococcus neoformans* cyclic AMP cascade. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 1, p. 190-201, Jan. 2005.

PURKINS, L. et al. Voriconazole, a novel wide-spectrum triazole: oral pharmacokinetics and safety. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 56, p. 10-16, 2003.

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, Feb. 1998.

RITTERSHAUS, P. C. et al. Glucosylceramide synthase is an essential regulator of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 6, p. 1651-1659, June 2006.

RODERO, L. et al. *In vitro* susceptibility studies of *Cryptococcus neoformans* isolated from patients with no clinical response to amphotericin B therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, p. 239-242, 2000.

RODRIGUES, M. L. et al. Cleavage of human fibronectin and other basement membrane-associated proteins by *Cryptococcus neoformans* serine proteinase. **Microbial Pathogenesis**, v. 34, p. 65-71, 2003.

ROSAS, A. L. et al. Isolation and sorological analyses of fungals melanin. **Journal of Immunological Methods**, v. 244, p. 69-80, 2000.

ROSAS, A. L.; CASADEVALL, A. Melanization decreases the susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to enzymatic degradation. **Mycopathologia**, v. 151, p. 53-56, 2000.

ROSAS, A. L.; CASADEVALL, A. Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, v. 153, p. 265-272, 1997.

ROZEMBAUM, R.; GONÇALVES, R. Clinical epidemiological study of 171 cases cryptococcosis. **Clinical Infectious Disease**, v. 18, p. 369-380, 1994.

SAAG, M. S. et al. Practice guidelines for the management of cryptococcal diseases. **Clinical Infectious Disease**, v. 30, n. 4, p. 710-718, Apr. 2000.

SAAG, M. S. et al. Comparison of amphotericin B with fluconazole in the treatment of acute aids-associated cryptococcal meningitis. The NIAID mycoses study group and the aids clinical trials group. **New England Journal of Medicine**, v. 326, n. 2, p. 83-89, Jan. 1992.

SCHIAVE, L. A. **Variabilidade na tolerância à radiação UVB de células melanizadas e não melanizadas entre linhagens de *Cryptococcus neoformans* e entre linhagens de *Cryptococcus laurentii***. 2007. 75f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Riberão Preto, 2007.

SCHOP, J. Protective immunity against *Cryptococcus neoformans* infection. **McGill Journal of Medicine**, v. 10, n. 1, p. 35-43, 2007.

SHAW, C. E.; KAPICA, L. Production of diagnostic pigment by phenoloxidase activity of *Cryptococcus neoformans*. **Applied Microbiology**, v. 24, n. 5, p. 824-830, 1972.

SILVA, C. M. M. S.; MELO, I. S.; OLIVERIA, P. R. Produção de enzimas lignolíticas por fungos isolados de solos sob cultivo de arroz irrigado. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 2004 (Boletim de Pesquisa).

SIMOR, A. E. et al. Antifungal susceptibility testing of yeast isolates from blood cultures by microbroth dilution and the E-Test. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 16, p. 693-697, 1997.

SOMMER, U. et al. An  $\alpha$ -1,3-mannosyltransferase of *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 48, p. 47724-47730, 2003.

SOTEROPOULOS, P. et al. Molecular characterization of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase, an antifungal target in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 9, p. 2349-2355, Sept. 2000.

SORRELL, T. C. et al. Natural environmental sources of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n. 5, p. 1261-1263, May 1996.

STAIB, F. *Cryptococcus neoformans* und *Guizotia abyssinica*. **Zeitschrift f. Hygiene**, v. 145, 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, p.667-675, 2003.

TANAKA, E et al. Comparisons of the laccase gene among serotypes and melanin-deficient variants of *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology and Immunology**, v. 49, n. 3, p. 209-217, Mar. 2005.

TANG, R. J. et al. *Cryptococcus neoformans* gene involved in mammalian pathogenesis identified by a *Caenorhabditis elegans* progeny-based approach. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 12, p. 8219-8225, Dec. 2005.

TORRES-RODRÍGUEZ, J. M. et al. MICs and minimum fungicidal concentrations of posaconazole, voriconazole and fluconazole for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Research letter, p. 1-2, Mar. 29, 2008.

VALDERRAMA, B. et al. Evolutionary and structural diversity of fungal laccases. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 84, p. 289-299, Mar. 2003.

VANDEBOSSCHE, I. et al. Susceptibility testing of fluconazole by the NCCLS broth macrodilution method, E-test, and disk diffusion for application in the routine laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n. 3, p. 918-921, Mar. 2002.

VAN DUIN, D. et al. Effects of voriconazole on *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 2014-2020, June 2004.

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A; NOSANCHUK, J. D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibility to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3394-3400, Nov. 2002.

VECCHIARELLI, A. et al. The polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans* interferes with human dendritic cell maturation and activation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 74, p. 370-378, Sept. 2003.

VECCHIARELLI, A. et al. Purified capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* induces interleukin-10 secretion by human monocytes. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 7, p. 2846-2849, July 1996.

VIVIANI, M. A. et al. First european case of serotype A MATa *Cryptococcus neoformans* infection. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 9, p. 1179-1180, Sept. 2003.

WAKAMATSU, K.; ITO, S. Advanced chemical methods in melanin determination. **Pigment Cell Research**, v. 15, p. 174-183, p. 2002.

WALENKAMP, A. M. E. et al. *Cryptococcus neoformans* and its cell wall components induce similar cytokine profiles in human peripheral blood mononuclear cells despite differences in structure. **Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology**, v. 26, p. 309-318, July 1999.

WALTON, F.J.; IDNURM, A.; HEITMAN, J. Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 1381-1396, Sept. 2005.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 8, p. 3131-3136, Aug. 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, July 1994a.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-dopa decreases its susceptibility to amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 11, p. 2648-2650, Nov. 1994b.

WARNOCK, D. W.; JOHNSON, E. M.; ROGERS, T. R. F. Multi-centre of evaluation of the E-test methods for antifungal drug susceptibility testing of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, p. 321-331, 1998.

WICKES, B. L. The role of mating type and morphology in *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 292, p. 313-329, 2002.

WICKES, B. L. et al. Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: association with the  $\alpha$ -mating type. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 7327-7331, July 1996.

WILDER, J. A. et al. Complementation of a capsule deficient *Cryptococcus neoformans* with Cap64 restores virulence in a murine lung infection. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 26, p. 306-314, 2002.

WILLIAMSON, P. R. et al. Melanin biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 6, p. 1570-1572, Mar. 1998.

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

WILLIAMSON, P. R. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 3, p. 656-664, Feb. 1994.

WILSON, D. E.; BENNETT, J. E.; BAILEY, J. W. Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. **Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 127, p. 820-823, 1968.

WRIGHT, L. C. et al. Strain-dependent effects of environmental signals on the production of extracellular phospholipase by *Cryptococcus neoformans*. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, v. 209, p. 175-181, Mar. 2002.

ZARAGOZA, O. et al. Effect of amphotericin B on capsule and cell size in *Cryptococcus neoformans* during murine infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4358-4361, Oct. 2005.

ZARAGOZA, O.; FRIES, B. C.; CASADEVALL, A. Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO<sub>2</sub>. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 11, p. 6155-6164, Nov. 2003.

ZHONG, Z.; PIROFSKI, L. A. Antifungal activity of human anti-glucuronoxylomannan antibody. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5, n. 1, p. 58-64, Jan. 1998.

ZHU, X.; WILLIAMSON, P. R. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Federation of European Microbiological Societies Yeast Research**, v. 5, p. 1-10, 2004.

ZHU, X.; WILLIAMSON, P. R. A CLC-type chloride channel gene is required for laccase activity and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1271-1281, 2003.

ZHU, L. et al. Case report. Pulmonary cryptococcosis associated with cryptococcal meningitis in non-AIDS patients. **Mycoses**, v. 45, p. 111-117, 2002.

ZHU, X. et al. Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 9, p. 5589-5596, Sept. 2001.

APÊNDICE A – Tabela dos valores das absorvâncias a 595 nm e concentração de proteína total em 50 µL das amostras de *C. neoformans* (clínicas, ambientais e ATCC 90112).

	Amostra	Reagente de Bradford (µL)	Água dest. (µL)	Alíquota do extrato (µL)	Abs. 595nm	[Proteína] (µg/50µL)	
C L I N I C A S	ICB 81	200	750	50	0,234	27,5	G E L  1
	ICB 154	200	750	50	0,216	25,3	
	VP Bet	200	750	50	0,243	28,7	
	ICB 95	200	750	50	0,187	21,8	
	HNR 41	200	750	50	0,208	24,4	
	RO1	200	750	50	0,193	22,6	G E L  2
	HNR 39	200	750	50	0,419	50,0	
	ICB 155	200	750	50	0,177	20,6	
	CN 103	200	750	50	0,188	22,0	
	ICB 23	200	750	50	0,154	17,9	
A M B I E N T A I S	ICB 169	200	750	50	0,171	19,9	G E L  3
	ICB 89 RN	200	750	50	0,160	18,6	
	ICB 189	200	750	50	0,156	18,2	
	ICB 88	200	750	50	0,142	16,4	
	RO2	200	750	50	0,138	16,0	
A T C C 9 0 1 1 2	Sul amb 3	200	750	50	0,090	10,1	G E L  4
	B 60	200	750	50	0,107	12,2	
	Sul amb 1	200	750	50	0,092	10,4	
	ICB 184	200	750	50	0,199	23,2	
	B 52	200	750	50	0,123	14,1	
A T C C 9 0 1 1 2	B 51	200	750	50	0,181	21,2	G E L  5
	B 79	200	750	50	0,144	16,6	
	BO 5	200	750	50	0,242	28,5	
	BO 2	200	750	50	0,132	15,3	
	ICB 187	200	750	50	0,124	14,2	
A T C C 9 0 1 1 2	ICB 178	200	750	50	0,200	23,5	G E L  6
	C 7	200	750	50	0,176	20,5	
	C 18	200	750	50	0,198	23,2	
	B 78	200	750	50	0,181	21,1	
	B 96	200	750	50	0,183	21,4	

## ANEXO A – Meio com L-dopa

Este meio é composto por duas soluções (A e B), preparadas separadamente da seguinte forma conforme Baroni (2001):

### Solução A

Fosfato de potássio monobásico	0,40 g
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,25 g
Glicose	0,50 g
Ágar	2,50 g
Água destilada	80,0 mL

### Preparo - Solução A

Em 50,0 mL de água destilada, dissolveu-se os componentes, à exceção do agar e ajustou-se o pH conforme determinado (5,0, 6,0 ou 7,0) com solução de hidróxido de sódio 1,0 M;

Adicionou-se o agar, completou-se o volume para 80 mL e esterilizou-se em autoclave por 15 min. a 121 °C.

### Solução B

L-dopa	0,004g
Tiamina (Protovit <sup>®</sup> )	6 gotas
Asparagina	0,100g
Glutamina	0,100g
Glicina	0,100g
Água destilada	20,0mL

### Preparo - Solução B

Em béquer com 20,0 mL de água destilada dissolveu-se os componentes sólidos e em seguida adicionou-se as gotas da Tiamina;

Procedeu-se a esterilização por filtração da solução, recebendo o filtrado em Erlemmeyer estéril envolvido em papel alumínio. Manteve-se o filtrado protegido da luz.

As soluções foram misturadas quando a solução A estava com temperatura entre 40 °C e 50 °C e o meio foi distribuído em placas de Petri de 60 mm de diâmetro.

### ANEXO B – Gel de corrida a 7 % e de empilhamento a 4 %.

#### Gel de corrida a 7 %:

Tampão do gel de corrida pH 8,9 (Anexo D)	1,0 mL
Solução de acrilamida estoque (Anexo E)	2,3 mL
Solução de persulfato de amônio – PSA a 10 % (Anexo F)	30,0 µL
TEMED	10,0 µL
Água destilada	6,7 mL

#### Gel de empilhamento a 4 %:

Tampão do gel de empilhamento pH 6,8 (Anexo G)	0,5 mL
Solução de acrilamida estoque	0,7 mL
Solução de PSA a 10 %	15,0 µL
TEMED	10,0 µL
Água destilada	3,8 mL

## ANEXO C – Tampão de eletrodo

Para 1,0 L de solução:

Tris		6,3 g
Glicina		4,0 g
Água destilada	q.s.p	1,0 L

Procedimentos:

- 1) Dissolver o tris e a glicina em aproximadamente 500 mL de água destilada;
- 2) Completar o volume de água destilada para 1,0 L.

Observação: Preparar no momento do uso.

## ANEXO D – Tampão do gel de corrida pH 8,9.

Para 100 mL de solução:

Tris		45,75 g
Água destilada	q.s.p	100,0 mL

Procedimentos:

- 1) Aquecer aproximadamente 60 mL de água destilada e dissolva o tris;
- 2) Após resfriar ajustar o pH para 8,9 com soluções de HCl 1,0 M ou NaOH 1,0 M;
- 3) Completar o volume de água destilada para 100,0 mL;
- 4) Armazenar a temperatura de  $\pm 25$  °C.

#### ANEXO E – Solução de acrilamida estoque.

Para 100 mL de solução:

Acrilamida	30,0 g
Bis acrilamida	0,8 g
Água destilada	q.s.p 100,0 mL

Procedimentos:

- 1) Dissolver a acrilamida e bis acrilamida em aproximadamente 50 mL de água destilada;
- 2) Completar o volume de água destilada para 100,0 mL;
- 3) Manter em frasco âmbar envolvido em papel alumínio e guardar em refrigerador.

Observação: Utilizar máscara e luvas durante o preparo da solução.

#### ANEXO F – Solução de persulfato de amônio (PSA) a 10 %

Para 0,5 mL de solução:

PSA	0,05 g
Água destilada	q.s.p 0,5 mL

Procedimentos:

Dissolver o PSA em 0,5 mL de água destilada;

Observação: Preparar no momento do uso.

#### ANEXO G – Tampão do gel de empilhamento pH 6,8.

Para 100 mL de solução:

Tris	7,475 g
Água destilada	q.s.p 100,0 mL

Procedimentos:

- 5) Dissolver o tris em aproximadamente 60 mL de água destilada;
- 6) Ajustar o pH para 6,8 com soluções de HCl 1,0 M ou NaOH 1,0 M;
- 7) Completar o volume de água destilada para 100,0 mL;
- 8) Armazenar a temperatura de  $\pm 25$  °C.

#### ANEXO H – Tampão de amostra

Para 25 mL de solução:

Glicerol	5,0 mL
Tampão do gel de empilhamento	2,5 mL
Azul de bromofenol	2,5 mg
Água destilada	q.s.p 25,0 mL

Procedimentos:

- 1) Dissolver o azul de bromofenol e o glicerol em tampão do gel de empilhamento;
- 2) Completar o volume de água destilada para 25,0 mL;
- 3) Guardar em refrigerador.

## ANEXO I – Tampão PBS pH 7,2

Para 1,0 L de solução:

Cloreto de sódio	8,5 g
Fosfato de sódio bibásico	0,56 g
Fosfato de potássio monobásico	0,14 g
Água destilada	q.s.p 1,0 L

Procedimentos:

- 1) Dissolver o cloreto de sódio, o fosfato de sódio bibásico e o fosfato de potássio monobásico em aproximadamente 500 mL de água destilada;
- 2) Ajustar o pH para 7,2 com soluções de HCl 1,0 M ou NaOH 1,0 M;
- 3) Completar o volume de água destilada para 1,0 L;
- 4) Manter a solução em refrigerador.

## ANEXO J – Meio mínimo definido com L-dopa (1,0 mM)

Extrato de Levedura	1,5g
Glicose	1,0g
Cloreto de amônio	0,5g
Solução de sais	100,0 mL
Solução de L-dopa	150,0 mL
Água destilada	750,0 mL

### Solução de sais

Fosfato de potássio monobásico	2,0 g
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,5 g
Cloreto de cálcio	0,1 g
Cloreto de potássio	0,5 g
Água destilada	1.000,0 mL
Solução de L-dopa (1,0 mM)	

L-dopa	0,1972 g
Água destilada	1.000,0 mL

### Preparo do meio

- 1) Em balão os componentes da solução de sais foram dissolvidos em 10 % do total da água destilada;
- 2) Na solução de sais adicionou-se metade do volume total de água destilada e dissolveu-se o extrato de levedura, a glicose e o cloreto de amônio;
- 3) Ajustou-se o pH para 5,5 e completou-se até 85% do volume total de água destilada;
- 4) Esterilizou-se em autoclave por 15 min. a 121°C;
- 5) Preparou-se a solução de L-dopa em 150 mL de água destilada (15 % do total) e esterilizou-se por filtração. Esta foi adicionada ao meio quando estava na temperatura de  $\pm 25^{\circ}\text{C}$  e tanto a solução quanto o meio com L-dopa foram mantidos ao abrigo da luz
- 6) Distribuiu-se 100 mL do meio com L-dopa em Erlenmeyers de 250 mL que foram mantidos ao abrigo da luz;