

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JORGE ANTONIO CHAMON JÚNIOR

**CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE *CRYPTOCOCCUS* SPP. E
DETERMINAÇÃO DE SUA SENSIBILIDADE À ANTIFÚNGICOS E AO EXTRATO
DE *EUGENIA DYSENTERICA***

BRASÍLIA
2016

JORGE ANTONIO CHAMON JÚNIOR

**CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE *CRYPTOCOCCUS* SPP. E
DETERMINAÇÃO DE SUA SENSIBILIDADE À ANTIFÚNGICOS E AO EXTRATO
DE *EUGENIA DYSENTERICA***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega

BRASÍLIA
2016

CC448 Chamon Júnior, Jorge Antonio
Caracterização dos isolados clínicos de
Cryptococcus spp. e determinação de sua sensibilidade
à antifúngicos e ao extrato de Eugenia dysenterica /
Jorge Antonio Chamon Júnior; orientador Yanna Karla
de Medeiros Nóbrega. -- Brasília, 2016.
71 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências
Farmacêuticas) -- Universidade de Brasília, 2016.

1. Cryptococcus neoformans. 2. Cryptococcus
gattii. 3. Eugenia dysenterica. 4. Atividade
antifúngica. I. de Medeiros Nóbrega, Yanna Karla ,
orient. II. Título.

JORGE ANTONIO CHAMON JÚNIOR

CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE *CRYPTOCOCCUS* SPP. E DETERMINAÇÃO DE SUA SENSIBILIDADE À ANTIFÚNGICOS E AO EXTRATO DE *EUGENIA DYSENTERICA*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 09 de dezembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dr^a. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega
Universidade de Brasília (UnB)

Prof. Dr. André Moraes Nicola
Universidade de Brasília (UnB)

Prof. Dr. Fabiano José Queiroz Costa
Hospital Universitário de Brasília (HUB)

*Dedico este empenho realizado a minha família,
aos meus amigos e a aqueles que lutam por dias
melhores.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar a vida de meus entes queridos com saúde e paz no coração.

À minha esposa por todo apoio, dedicação, carinho, incentivo, paciência e amor recíproco.

Aos meus filhos César e Vitor por me fazer acreditar no real sentido da vida.

À minha mãe, irmã e vó pela dedicação e zelo em toda minha formação como ser humano e profissional.

À minha grande família, pela convivência, relações humanísticas e completo apoio de sempre.

Aos amigos queridos, de perto e de longe, a minha eterna gratidão e companheirismo sem fins individualistas e lucrativos.

A minha orientadora Yanna por sua conduta transparente, colaborativa e norteadora durante todo este processo.

Aos meus colegas de trabalho do Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF), especialmente a servidora e amiga Amabel Fernandes Correia por toda injeção de ânimo e por me julgar apto a este desafio.

Aos meus superiores hierárquicos Graziela Araújo e Eduardo Filizzola, por todo incentivo.

Aos meus mestres e professores, muito obrigado pelo conhecimento difundido, lições de vida e aprendizado técnico.

Aos meus alunos que sempre me incentivaram pela busca da informação fidedigna e aplicada aos diversos contextos da vida.

A todos que duvidaram de minha capacidade, muito obrigado, pois vocês foram combustíveis ilimitados para minhas atividades.

A todos que acreditaram no meu potencial, nas minhas atividades laborais, nas minhas ideias, nos meus devaneios, principalmente quando nem eu mais acreditava.

Sem todas esses auxílios e demonstrações afetivas, nada disso seria possível.

RESUMO

CHAMON JÚNIOR, Jorge Antonio. CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE *CRYPTOCOCCUS* SPP. E DETERMINAÇÃO DE SUA SENSIBILIDADE À ANTIFÚNGICOS E AO EXTRATO DE *EUGENIA DYSENTERICA*, 2016. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

Introdução: A criptococose vem assumindo um papel relevante dentre as infecções fúngicas oportunistas por ser considerada uma das micoses mais comuns nos indivíduos imunodeprimidos apresentando elevada morbidade e mortalidade, com cerca de 650.000 mortes por ano em todo mundo. Esta doença é causada pelos fungos leveduriformes encapsulados *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. O *C. neoformans* acomete pacientes imunocomprometidos, já o *C. gattii*, vem se tornando um grave problema de saúde pública, pois é capaz de acometer pacientes imunocompetentes. Fato que promove ainda mais preocupação é o fato de existir escassos medicamentos antifúngicos disponíveis, que possuem elevada toxicidade e já apresentam resistência por mecanismos pouco elucidados. Diante destas circunstâncias, estratégias farmacológicas vem sendo estudadas e desenvolvidas, inclusive empregando extratos de plantas com potencial terapêutico. Neste sentido, o estudo do efeito antifúngico do extrato aquoso das folhas de *Eugenia dysenterica* (Mart.) DC sobre isolados de *Cryptococcus* spp foi realizado.

Objetivos: Identificar isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. por métodos clássicos, bioquímicos, manuais e automatizados, moleculares e por espectrometria de massa, visando caracterizá-los fenotipicamente e genotipicamente, e avaliar o perfil de susceptibilidade aos agentes antifúngicos convencionais e ao extrato aquoso bruto de *Eugenia dysenterica*.

Materiais e métodos: Neste estudo, 20 isolados clínicos contendo *Cryptococcus* spp. foram submetidos a identificações microscópicas (tinta nanquim e hidróxido de potássio), provas bioquímicas manuais (assimilação de glicina, produção de urease e melanina), provas bioquímicas automatizadas, PCR-RFLP e espectrometria de massa (MALDI-TOF). Além disso, foi realizado teste de suscetibilidade a antifúngicos convencionais e microdiluição em placa para o extrato aquoso de folhas de *E. dysenterica*.

Resultados: A partir da diversas metodologias empregadas obtivemos a caracterização das espécies (12 *C. neoformans* e 8 *C. gattii*) e variantes (12 VNI e 8 VGII), assim como a presença de resistência aos antifúngicos usuais (3 casos de resistência a Anfotericina B). Além da demonstração do efeito antifúngico do extrato de *E. dysenterica*.

Conclusão: Neste estudo, visualizou-se o predomínio da espécie *C. neoformans* VNI frente a *C. gattii* VGII, em consonância com os estudos já realizados e as informações epidemiológicas existentes, e que esta caracterização é fundamental para fins terapêuticos e de saúde pública, diante do quadro de limitação de tratamento e iminentes casos de resistências a antifúngicos. Além disso, fornece subsídios para que o extrato aquoso de *E. dysenterica* seja considerado a um forte candidato na elaboração de novos fármacos antifúngicos.

Palavras chaves: *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, *Eugenia dysenterica*, atividade antifúngica

ABSTRACT

CHAMON JÚNIOR, Jorge Antonio. CHARACTERIZATION OF THE CLINICAL ISOLATES OF *CRYPTOCOCCUS* SPP. AND DETERMINATION OF ITS SENSITIVITY TO ANTIFUNGS AND THE EXTRACT OF *EUGENIA DYSENTERICA*, 2016. Dissertation (Master in Pharmaceutical Sciences) - Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Brasília, 2016.

Introduction: Cryptococcosis has been playing an important role among fungal opportunistic infections, being considered one of the most common mycoses in immunocompromised individuals presenting high morbidity and mortality, with around 650,000 deaths per year worldwide. This disease is caused by the encapsulated yeast *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *C. neoformans* affects immunocompromised patients, and *C. gattii* has become a serious public health problem since it is capable of injuring immunocompetent patients. A fact that promotes even more concern is the fact that there are few antifungal drugs available, which present high toxicity and are already resistant by poorly elucidated mechanisms. Facing these circumstances, pharmacological strategies have been studied and developed, including using plants with therapeutic potential in their extracts. In this sense, the study of the antifungal effect of the aqueous extracts of *Eugenia dysenterica* (Mart.) DC leaves on *Cryptococcus* spp isolates was performed.

Objectives: To identify clinical isolates of *Cryptococcus* spp. by classical, biochemical manual and automated, molecular and mass spectrometry methods, aiming to characterize them phenotypically and genotypically. Added to this is the assessment of the susceptibility profile to the conventional antifungal agents and to the crude aqueous extract of *Eugenia dysenterica*.

Materials and methods: In this study, 20 clinical isolates containing *Cryptococcus* spp. (Glycine assimilation, urease and melanin production), automated biochemical tests, PCR-RFLP and mass spectrometry (MALDI-TOF) were performed. In addition, the antifungal susceptibility test and plaque microdilution for the aqueous extract of leaves of *E. dysenterica* were performed.

Results: Based on the different methodologies used, we characterized the species (12 *C. neoformans* and 8 *C. gattii*) and variants (12 VNI and 8 VGII), as well as the presence of resistance to the usual antifungal agents (3 cases of resistance to Amphotericin B). In addition to demonstrating the antifungal effect of *E. dysenterica* extract.

Conclusion: In this study, the prevalence of the *C. neoformans* VNI species in relation to *C. gattii* VGII was observed, in agreement with the studies already carried out and the existing epidemiological information, and that this characterization is fundamental for therapeutic and public health purposes, In view of the limitation of treatment and imminent cases of antifungal resistance. In addition, it provides subsidies for the aqueous extract of *E. dysenterica* to be considered a strong candidate in the development of new antifungal drugs.

Key words: *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, *Eugenia dysenterica*, antifungal activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas celulares de leveduras do gênero <i>Cryptococcus</i>	13
Figura 2 - Forma celular de <i>Cryptococcus</i> spp.	19
Figura 3 - Técnica de microscopia ótica para visualização de <i>Cryptococcus</i> spp	21
Figura 4 - Colônias de <i>Cryptococcus</i> spp. em meios de cultivo	22
Figura 5 - Crescimento de <i>Cryptococcus</i> spp. em ágar CGB	22
Figura 6 - Identificação bioquímica de <i>Cryptococcus</i> spp. em meio ureia-ágar-base	23
Figura 7 - Flores e frutos de <i>Eugenia dysenterica</i> (Mart.) DC	28
Figura 8 - Visualização microscópica de <i>Cryptococcus</i> spp.	39
Figura 9 - Aspectos macroscópicos <i>Cryptococcus</i> spp. em meios de cultura	41
Figura 10 - Espectros de <i>Cryptococcus</i> na plataforma VITEK MS	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies atuais e propostas para o complexo <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i>	15
Tabela 2 - Isolados clínicos de pacientes com suspeita de micoses sistêmicas	30
Tabela 3 - Teste de identificação bioquímica para <i>Cryptococcus</i> spp.	31
Tabela 4 - Cepas de referência do complexo <i>Cryptococcus</i> spp.	34
Tabela 5 - Características microscópicas das amostras biológicas por exame direto	39
Tabela 6 - Resultados dos testes bioquímicos manuais.....	40
Tabela 7 - Técnicas utilizadas na identificação de <i>Cryptococcus</i> spp.	44
Tabela 8 - ECV para drogas antifúngicas usadas no tratamento da criptococose	45
Tabela 9 - Resultados dos testes de susceptibilidade do Vitek 2 Compact	45
Tabela 10 - CIM de FLU (controle) e <i>E. dysenterica</i>	46

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FC	5-fluorocitosina
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
AIDS	Síndrome da Imundeficiência Adquirida
CEP/SES-DF	Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde do DF
CGB	L-canavanina, glicina e azul de bromotimol
CFW	Branco de Calcoflúor
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECV	<i>Epidemiologic Cutoff Value</i>
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FNT	Fator de Necrose Tumoral
GXM	Glucuronoxilomanana
LACEN-DF	Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight</i>
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
NPM	Núcleo de Parasitologia e Micologia
PAS	Ácido periódico Schiff
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR <i>fingerprint</i>	Reação em Cadeia da Polimerase <i>fingerprint</i>
PCR <i>multiplex</i>	Reação em Cadeia da Polimerase <i>multiplex</i>
PCR <i>nested</i>	Reação em Cadeia da Polimerase <i>nested</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
Var	Variedade
VG	Variedade <i>gattii</i>
VN	Variedade <i>neoformans</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 O gênero <i>Cryptococcus</i>	13
1.2 Aspectos taxonômicos	14
1.3 Fatores de virulência	15
1.4 Aspectos morfológico-químicos	18
1.5 Criptococose	19
1.6 Diagnóstico laboratorial	20
1.7 Tratamento	25
1.8 <i>Eugenia dysenterica</i> (Mart.) DC	27
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos Específicos	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Caracterização microbiológica	30
3.1.1 Amostras	30
3.1.2 Exame direto.....	30
3.1.3 Isolamento fúngico.....	31
3.1.4 Conservação dos isolados clínicos.....	31
3.1.5 Testes bioquímicos manuais.....	31
3.1.6 Testes bioquímicos automatizados.....	32
3.1.7 Método molecular PCR-RFLP.....	32
3.1.7.1 Extração do DNA do <i>Cryptococcus</i> spp.	32
3.1.7.2 Método de PCR-RFLP.....	33
3.1.8 Espectrometria de massa.....	34
3.2 Determinação do perfil de susceptibilidade de <i>Cryptococcus</i> spp.	35
3.2.1 Agentes antifúngicos.....	35
3.2.2 Preparo do inóculo fúngico.....	35
3.2.3 Leitura e interpretação dos resultados.....	35
3.3 Avaliação da atividade antifúngica do extrato aquoso de <i>Eugenia dysenterica</i>	36
3.3.1 Material botânico.....	36
3.3.2 Extração botânica.....	36
3.3.3 Concentração Inibitória Mínima.....	36
3.3.3.1 Preparação do meio de cultura.....	36
3.3.3.2 Preparo do inóculo fúngico.....	37
3.3.3.3 Preparação da solução estoque.....	37
3.3.3.4 Preparação da placa.....	37
3.3.4 Leitura e interpretação dos resultados.....	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 Características microbiológicas dos isolados clínicos.....	39
4.2 Perfil de susceptibilidade de <i>Cryptococcus</i> spp.	44
4.3 Atividade antifúngica do extrato aquoso de <i>Eugenia dysenterica</i>	45
5 CONCLUSÕES	47

6 REFERÊNCIAS.....	49
7 ANEXO.....	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 O gênero Cryptococcus

O gênero *Cryptococcus* compreende fungos basidiomicetos, leveduriformes, encapsulados, embora existam formas acapsuladas ou deficientes em cápsulas, que apresentam tamanho entre 2 a 10 µm de diâmetro (COSTA, 2009). Em geral, suas células são compostas de cápsula, parede celular, membrana celular, núcleo e citoplasma com organelas como: corpúsculo de Golgi, mitocôndria, ribossomo, retículo endoplasmático e vacúolo (Figura 1) (NAYAK et al., 2010).

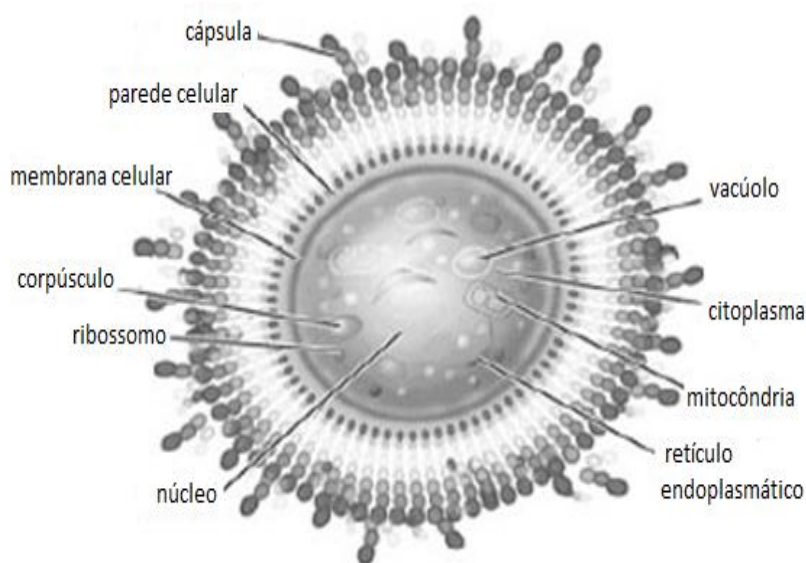


Figura 1 - Estrutura celular de levedura do gênero *Cryptococcus*
 Fonte: Adaptado de NAYAK et al., 2010

Existem cerca de 40 espécies de *Cryptococcus*, sendo a grande maioria de vida livre. As espécies patogênicas infectam mamíferos, aves e insetos, causando infecções sistêmicas e cutâneas. Dentre estas espécies destacam-se duas de grande impacto clínico: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (ELLIS & PFEIFFER, 1990; SORRELL, 2001).

Em relação ao *C. neoformans*, sabe-se que é um fungo cosmopolita e responsável pela maioria das infecções criptocócicas em indivíduos imunocomprometidos, sejam pacientes com Síndrome da Imodeficiência Adquirida (AIDS), aqueles submetidos a terapias imunossupressoras, transplantados, com doenças linfoproliferativas e desnutridos

(FERNANDES et al., 2000; DARZÉ et al., 2000; COGLIATI, 2013; RIVERA et al., 2015; GUTCH et al., 2015).

Os principais reservatórios do *C. neoformans* são fezes de pombos e de outras aves, troncos ocos de diferentes espécies de árvores e guano (fezes de morcego acumuladas e empregadas como fertilizante), o que torna este fungo extremamente disseminado em diferentes tipos de ambientes (NWEZE et al., 2015).

No que se refere ao *C. gattii*, caracteriza-se como um fungo endêmico para as regiões tropicais e subtropicais, sendo responsável por até 80 % das infecções criptocócicas em hospedeiros imunocompetentes (KWONG-CHUNG & BENNETT, 1992; SORRELL, 2001; SMITH & KAUFFMAN, 2012; PAULA et al., 2014), representando grave problema de saúde pública (CASADEVALL & PERFECT, 1998; TRILLES et al., 2008).

C. gattii também apresenta nicho ecológico bastante diversificado, podendo estar presentes em troncos de árvores em decomposição, solo, água doce e salgada (KIDD et al., 2007; DATTA et al., 2009; BYRNES et al., 2009a; WALRAVEN et al., 2011). Entre as árvores em que há a presença de *C. gattii* destacam-se o *Eucalyptus* spp. (eucalipto), *Abies* spp. (abeto), *Acer* spp. (bordo), *Alnus glutinosa* (amieiro), *Cedrus* spp. (cedro), *Pinus* spp. (pinheiro) e *Quercus* spp. (carvalho) (SPRINGER & CHATURVEDI, 2010), e em algumas espécies de cactos (LOPERENA-ALVAREZ et al., 2010).

No Brasil, a presença do *C. neoformans* ocorre em todas as regiões do país, divergindo em relação ao *C. gattii*, que se comporta como patógeno principalmente nas regiões Norte e Nordeste do país (TRILLES et al., 2008).

Outras espécies são raramente identificadas incluindo *C. laurentii*, *C. albidus*, *C. uzbekistanensis*, *C. adeliensis*, *C. curvatus*, *C. magnus*, *C. humicolus*, *C. luteolus*, *C. macerans*, *C. flavescens* e *C. uniguttulatus* (PEDROSO et al., 2007; LEITE JR et al., 2012).

1.2 Aspectos taxonômicos

O gênero *Cryptococcus* apresenta características genotípicas, epidemiológicas e genéticas que possibilitam classificá-lo em variedades, sorotipos e genótipos moleculares (ENANCHE-ANGOULVANT et al., 2007; BOVERS et al., 2008; HUSTON & MODY, 2009). Observa-se que *C. neoformans* apresenta duas variedades, *var. grubii* (sorotipo A) e *var. neoformans* (sorotipo D), podendo haver um híbrido (sorotipo AD), já o *C. gattii* inclui

sorotipos B e C (FRANZOT et al., 1997; MEYER et al., 2009; TELLO, et al., 2013; NÁGARAJHA SELVAN et al., 2014).

Com os avanços em estudos moleculares permitiu-se uma classificação mais detalhada, dividida em nove genótipos moleculares. O *C. neoformans var. grubii* classificado em VNI, VNII e VNB, o *C. neoformans var. neoformans* em VNIV, o híbrido em VNIII, *C. gattii* em VGI, VGII, VGIII, VGIV e VGV (LEVITZ & BOEKHOUT, 2006; ENANCHE-ANGOULVANT et al., 2007).

O incremento de análises filogenéticas possibilita inferir que o *C. gattii* difere-se do *C. neoformans* em cerca de 37 milhões anos. Além disso, sugere que a *var. grubii* e a *var. neoformans* possuem uma diferença de aproximadamente 19 milhões de anos, conforme cálculos com base na média ponderada de divergência entre o aparecimento de dois genes codificadores de proteínas (XU et al., 2000; MARRA et al., 2004).

A junção de técnicas filogenéticas e de biologia molecular como *Multilocus Sequence Typing* (MLST), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), *PCR fingerprint* e *Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) permite a confecção de uma proposta, ainda que controversa, de alteração de nomenclatura das espécies atuais, criando a perspectiva de novas espécies como *C. deneoformans*, *C. bacilliisporus*, *C. deuterogattii*, *C. tetragattii* e *C. decagattii*, além de associações entre espécies e formas híbridas, *Cryptococcus deneoformans* x *Cryptococcus gattii* híbrido, *Cryptococcus neoformans* x *Cryptococcus gattii* híbrido e *Cryptococcus deneoformans* x *Cryptococcus deuterogattii* híbrido (Tabela 1) (HAGEN et al., 2015; NYAZIKA et al., 2016).

Tabela 1 – Espécies atuais e propostas para o complexo *C. gattii* e *C. neoformans*

Nomenclatura da espécie atual	Clados obtidos por MLST / Genótipos obtidos por AFLP	PCR-fingerprint / Genótipos obtidos por RFLP	Nomenclatura da espécie proposta
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	Clado F, AFLP1	VNI	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	Clado G, AFLP1A/VNB	VNII	
	Clado H, AFLP1B	VNII	
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>Neoformans</i>	Clado I, AFLP2	VNIV	<i>Cryptococcus deneoformans</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i> híbrido	AFLP3	VNIII	<i>Cryptococcus neoformans</i> x <i>Cryptococcus deneoformans</i> híbrido
<i>Cryptococcus gattii</i>	Clado D, AFLP4	VGI	<i>Cryptococcus gattii</i>
	Clado C, AFLP5	VGIII	<i>Cryptococcus bacillisporus</i>
	Clado A, AFLP6	VGII	<i>Cryptococcus deuterogattii</i>
	Clado E, AFLP7	VGIV	<i>Cryptococcus tetragattii</i>
	Clado B, AFLP10	VGIV/GIIIc	<i>Cryptococcus decagattii</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> x <i>Cryptococcus gattii</i> AFLP4/VGI híbrido	AFLP8		<i>Cryptococcus deneoformans</i> x <i>Cryptococcus gattii</i> híbrido
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> x <i>Cryptococcus gattii</i> AFLP4/VGI híbrido	AFLP9		<i>Cryptococcus neoformans</i> x <i>Cryptococcus gattii</i> híbrido
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> x <i>Cryptococcus gattii</i> AFLP6/VGII híbrido	AFLP11		<i>Cryptococcus deneoformans</i> x <i>Cryptococcus deuterogattii</i> híbrido

Fonte: Adaptado de HAGEN et al., 2015

1.3 Fatores de virulência

O gênero *Cryptococcus* apresenta inúmeros fatores de virulência, dos quais se destacam a habilidade de crescer a 37 °C, a presença de cápsula, produção de melanina, urease, fosfolipase e proteases (STEENBERGEN & CASADEVALL, 2003; PEDROSO et al., 2009; LIN, 2009; DOERING, 2009; EISENMAN & CASADEVALL, 2012; PAULA, et al., 2014; LEV et al., 2016). Estes fatores são alvos de muitos estudos que visam identificar quais genes estão envolvidos no processo de virulência (OKABAYASHI et al., 2007; ROSA e

SILVA et al., 2008) e são significativos para a determinação do grau de patogenicidade, assim como as características e estado imunológico do hospedeiro (REOLON et al., 2004).

A capacidade do *Cryptococcus* spp. em se desenvolver a 37 °C ou de ter termotolerância é fundamental, isso possibilita o crescimento e a multiplicação destes fungos à temperatura corporal dos mamíferos, entre 37 a 39 °C (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; CASADEVALL & PERFECT, 1998; BARBOSA JÚNIOR et al., 2013).

A cápsula polissacarídica geralmente é composta por três componentes: manoproteína, galactoxilomanana e glucuronoxilomanana (GXM). A GXM é um polímero de alto peso molecular, responsável por cerca de 90 % em massa, da constituição da estrutura capsular (STEENBERGEN et al., 2003). Esta estrutura confere uma morfologia única em relação a outras leveduras patogênicas, que irá proteger o fungo, dificultando a apresentação de antígenos para as células T, diminuindo a resposta imunológica do hospedeiro. Esta cápsula reduz a fagocitose, prejudicando a ação leucocitária, além de impedir a ligação dos receptores do sistema complemento aos leucócitos (COEJAERTS, 2006; PEDROSO, 2008).

A presença de melanina é importante para o fungo por atuar como um antioxidante, protegendo-o da destruição intracelular por células fagocíticas. Além disso, a produção de melanina impede a ação do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) produzido por macrófagos ativado (WONG et al., 1990; CHATURVEDI et al., 1996; DOLANDES FRANCO, 2001). Por essas propriedades a melanina promove a resistência a radiação ultravioleta, a diminuição da susceptibilidade para anfotericina B e a resistência a agentes oxidantes (WANG & CASADEVALL, 1994; WANG et al., 1995; SALAS et al., 1996; BARBOSA JÚNIOR et al., 2013).

A enzima urease é codificada pelo gene *Ure1* e é secretada pelo fungo durante os quadros patológicos. Esta enzima participa do processo de interação patógeno-hospedeiro, aumentando o pH, favorecendo principalmente a infecção pulmonar e a invasão do sistema nervoso central (SNC) por via hematogênica (COX et al., 2000; OLSZEWSKI et al. 2004; REOLON et al., 2004; PEDROSO, 2008).

As fosfolipases e proteinases são consideradas fatores de virulência em leveduras em geral (BUCHANAN & MURPHY, 1998; PESSOA et al, 2012) sendo relacionadas à invasão fúngica no sistema imunológico do hospedeiro, favorecendo a disseminação hematogênica e o acometimento das meninges (SANTANGELO et al, 1999; PESSOA et al, 2012). As fosfolipases em especial podem provocar desestabilização de membranas celulares, podendo causar lise e liberação de componentes lipídicos (GHANNOUM, 2000).

1.4 Aspectos morfológicos

Cryptococcus spp. configura-se como levedura haploide, capsulada, ovalada, arredondada ou elipsoide medindo entre de 2 a 10 µm de diâmetro (Figura 2), com a possibilidade de apresentar brotamento único ou múltiplo (KWON-CHUNG & FELL, 1987; LACAZ et al., 2002; FAGANELLO et al., 2006; NAYAK et al., 2010).

Em ágar Sabouraud as colônias são mucoides, brilhantes, com margem lisa e inteira, e com a cor entre o branco e o creme (FRIES et al., 2001). O ágar Níger ou ágar *staib* também pode ser utilizado, e quando há crescimento, as colônias são marrons, devido a produção de melanina, característica marcante do *C. neoformans* e *C. gattii*, (JACOBSON, 2000; PEDROSO et al., 2007; YAMAMURA, et al., 2013). Entretanto pode haver colônias não produtoras de melanina, chamadas cepas albinas (MANDAL et al., 2007).

Sobre os aspectos bioquímicos, *C. neoformans* e *C. gattii* não fermentam carboidratos, mas assimilam por mecanismo oxidativo a glicose, maltose, sacarose, galactose, trealose, melizitose, D-xilose, L-raminose, sorbitol, manitol, dulcitol, D-manitol, α-metil-deglicosídeo, salicina, inositol e frutose. Também hidrolisam a uréia, por ação da urease e produzem fosfolipases e proteases (DE HOOG et al., 2000; CASALI et al., 2003; CAMPOS E BARONI, 2010).

A detecção da enzima urease é realizada utilizando-se meio uréia-ágar-base, no qual se observa a hidrólise da uréia e produção de amônio, aumentando o potencial hidrogeniônico (pH) e fornecendo uma coloração rósea intensa (ARAÚJO JÚNIOR et al, 2015).

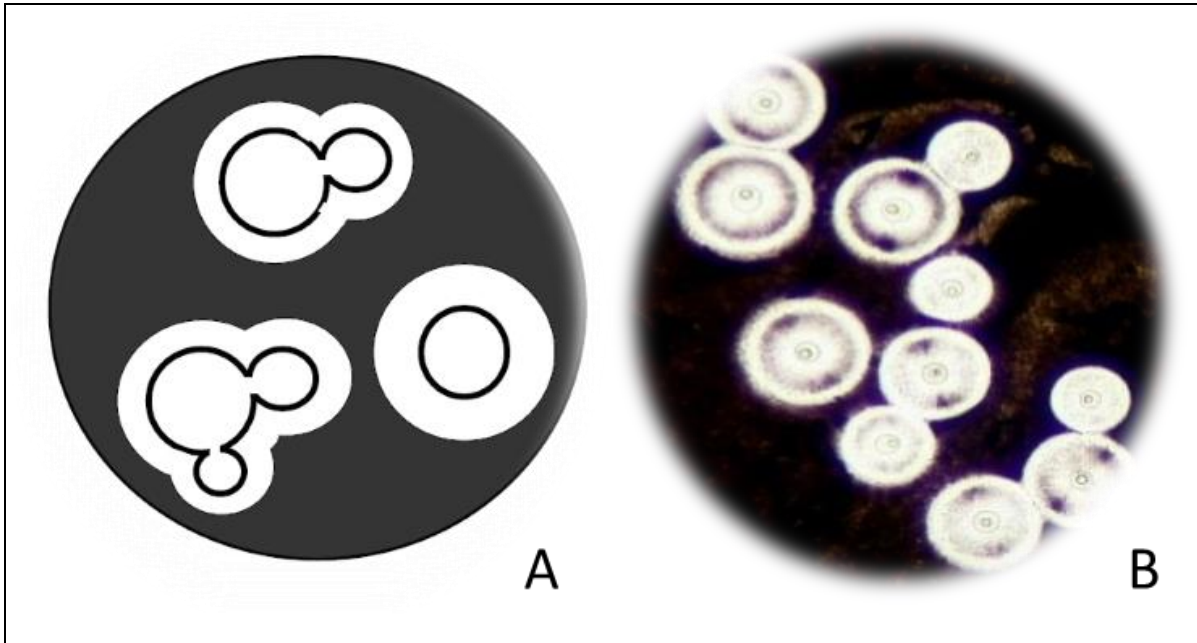


Figura 2 - Forma celulares de *Cryptococcus* spp.

Estrutura esquemática de *Cryptococcus* spp. em brotamento (A) e *Cryptococcus* spp. em brotamento visualizado em tinta nanquim (B)

Fonte: Adaptado de ZARAGOZA et al., 2006; LOURENÇO, 2015

1.5 Criptococose

A criptococose, também chamada de torulose, doença de Busse-Buschke e blastomicose européia, vem assumindo um papel relevante dentre as infecções fúngicas oportunistas por ser considerada uma das micoses mais comuns nos indivíduos imunodeprimidos (DARZÉ et al., 2000; LOCKHART et al., 2013). O impacto desta doença é extremamente significativo, apresentando elevada morbidade e mortalidade, sendo evidenciado em populações com acesso limitado aos serviços de saúde, acarretando cerca de 650.000 mortes por ano em todo mundo (PARK et al., 2009; HAYNES et al., 2011; TEODORO et al., 2013; PERFECT, 2013; MCCLELLAND et al., 2013; WANG et al., 2015; NYAZIKA et al., 2016).

O *C. neoformans* e *C. gattii* são as espécies que geralmente causam a criptococose, doença de impactante associação com pacientes portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (*Acquired Immune Deficiency Syndrome – AIDS*), principalmente na África subsaariana e no sudeste da Ásia, áreas com alta incidência de infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Virus - HIV*) (PARK et al., 2009; ASSOGBA et al., 2015; COGLIATI et al., 2016). Entretanto, atualmente a doença cada vez mais é encontrada em pacientes não infectados por HIV, como indivíduos com neoplasias

hematológicas, transplantados de órgãos e com doenças autoimunes (BRATTON et al., 2012; SANCHINI et al., 2014; HENAO-MARTÍNEZ & BECKHAM, 2015).

A criptococose é contraída pela inalação de partículas infecciosas, sejam esporos, estruturas fúngicas secas e/ou células de levedura em aerossol (ZAITZ et al., 2010; NASSER et al., 2011; LEV et al., 2015). Nos pulmões permanecem latentes até a ocorrência de alguma falha do sistema imunológico, havendo ativação e disseminação para o SNC, pele, ossos, articulações, olhos e coração (PAL & DAVE, 2006; PANTOJA et al., 2006; COSTA et al., 2014).

Inicialmente ocorre infecção pulmonar, com possibilidade de cursar com quadro de pneumonia (NAYAK et al., 2010). Com a predileção do fungo pelo SNC, a meningoencefalite instala-se (TSENG et al., 2013; COLOMBO & RODRIGUES, 2015), podendo ocorrer mais raramente trombose do seio venoso cerebral (SENADIM et al., 2016).

A presença do *Cryptococcus* spp. ainda pode culminar com a criptococemia e a produção de biofilmes em dispositivos médicos, como cateteres, fístulas e próteses de válvulas cardíacas, devido sua disseminação hematogênica (MARTINEZ & CASADEVALL, 2015; BENADUCCI et al., 2016).

Em 10 a 15 % dos casos de criptococose sistêmica ocorrem lesões cutâneas, que raramente são oriundas de inoculação primária na pele. Em situações mais graves pode haver necrose cutânea (BIVANCO, et al., 2006; LIU, et al., 2015; JACKSON & HERRING, 2015).

1.6 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da criptococose pode ser feito a partir de uma grande variedade de espécimes clínicos, como: líquido, urina, fragmentos de tecido, aspirados de lesões cutâneas, sangue, escarro e lavado bronco-alveolar (MEZZARI et al., 2013).

A identificação de fungos do gênero *Cryptococcus* pode ser feita por microscopia, cultura, provas bioquímicas manuais e automatizadas, sorologia, espectrometria de massa, técnicas moleculares e testes histológicos (MITCHELL & PERFECT, 1995; AMARO, 2006; POSTERARO, et al., 2012).

A microscopia possibilita a visualização de leveduras encapsuladas (Figura 3) após preparação do espécime clínico com tinta da China, nigrosina, nanquim ou *nankin*, a qual permite a visualização nítida de um halo claro em torno da célula, que representa a cápsula não corada (NAMIQ et al., 2005; MENDES, 2009; XAVIER, et al., 2009). Além disso, pode

ser utilizado o reagente branco de calcoflúor (CFW) para visualização do aspecto leveduriforme em microscópio de fluorescência (HARRINGTON & HAGEAGE, 2003; GALANIS et al, 2009).

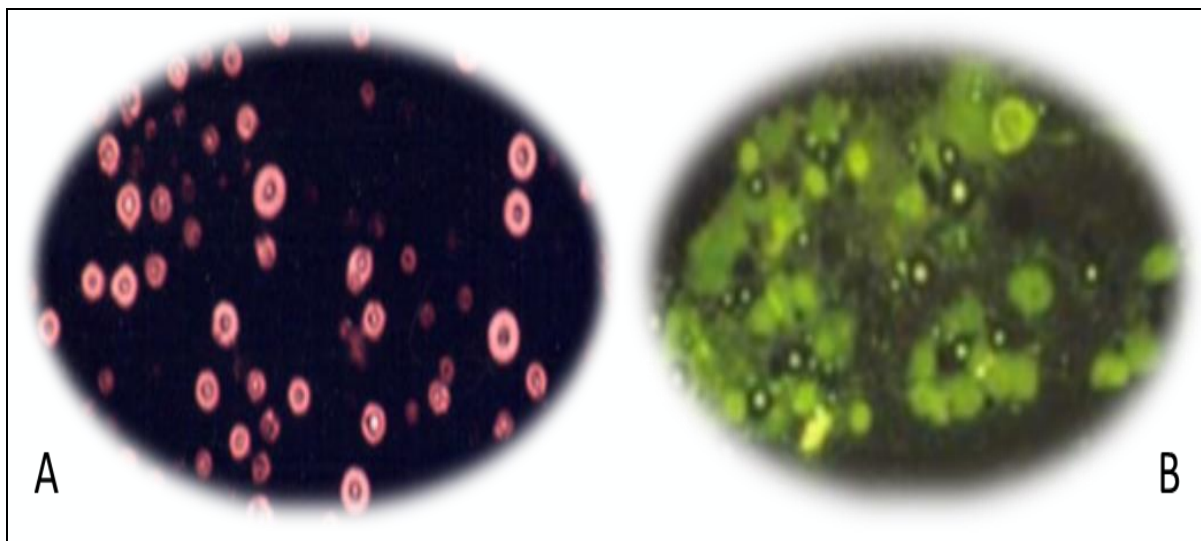


Figura 3 - Técnica de microscopia ótica para visualização de *Cryptococcus spp.*
Cryptococcus spp. visualizados em tinta da China (A) e *Cryptococcus spp.* visualizados em fluorescência após preparação com CFW (B)

Fonte: Adaptado de HARRINGTON & HAGEAGE, 2003; NASSER et al., 2011

O isolamento de *Cryptococcus spp.* pode ser feito em meios de cultura como ágar Sabouraud. Além disso é utilizado o ágar Níger para a caracterização da produção de melanina e ágar à base de L-canavanina, glicina e azul de bromotimol (CGB), que apresenta coloração diferente utilizada na diferenciação entre as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* (GALANIS, et al, 2009; KLEIN et al., 2009; PEREIRA & BARROS, 2012; MORA et al., 2015).

As colônias em ágar Sabouraud crescem com aspecto superficial brilhante, liso, com consistência cremosa a mucoide, coloração branca a bege. No ágar Níger, as colônias apresentam coloração marrom claro a marrom escuro (Figura 4), devido a produção de melanina (SANTOS et al., 2009; FARIA et al., 2010).

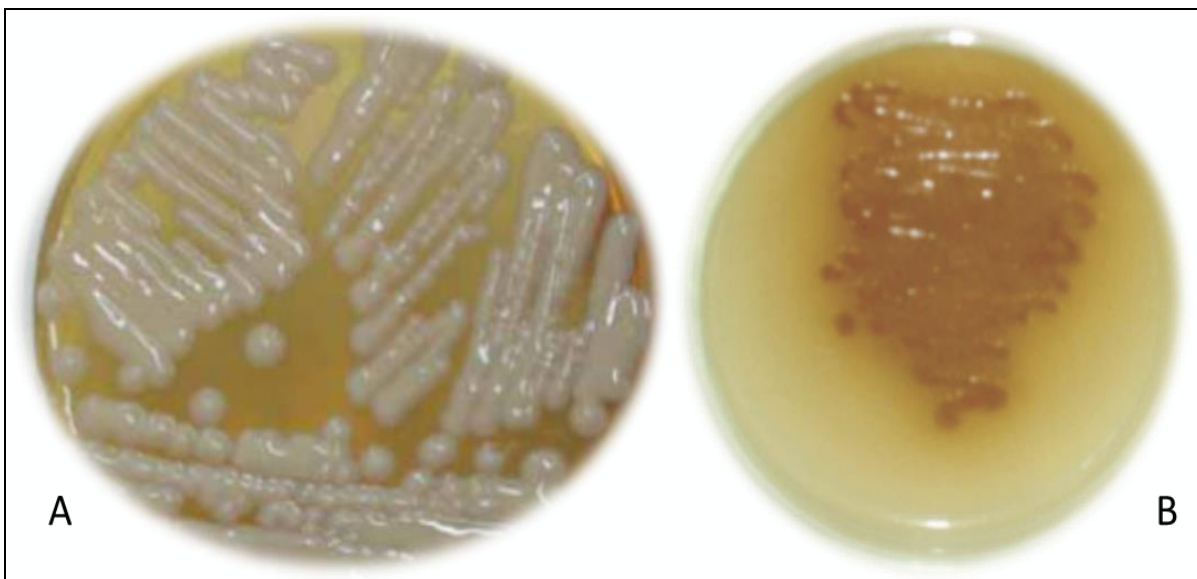


Figura 4 - Colônias de *Cryptococcus spp.* em meios de cultivo
Em ágar Sabouraud (A) e colônias de *Cryptococcus neoformans* em ágar Níger (B)
Fonte: Adaptado de GOMES et al., 2010; NASSER et al, 2011

No ágar CGB (Figura 5), quando há crescimento significa que as colônias são canavanina resistentes e capazes de utilizar a glicina como uma única fonte de carbono, provocando a cor azul, o que é indicativo de *C. gattii*. Quanto ao *C. neoformans*, este é sensível à canavanina e não utiliza a glicina como uma única fonte de carbono, não havendo crescimento e alteração de coloração (BYRNES et al., 2009b).

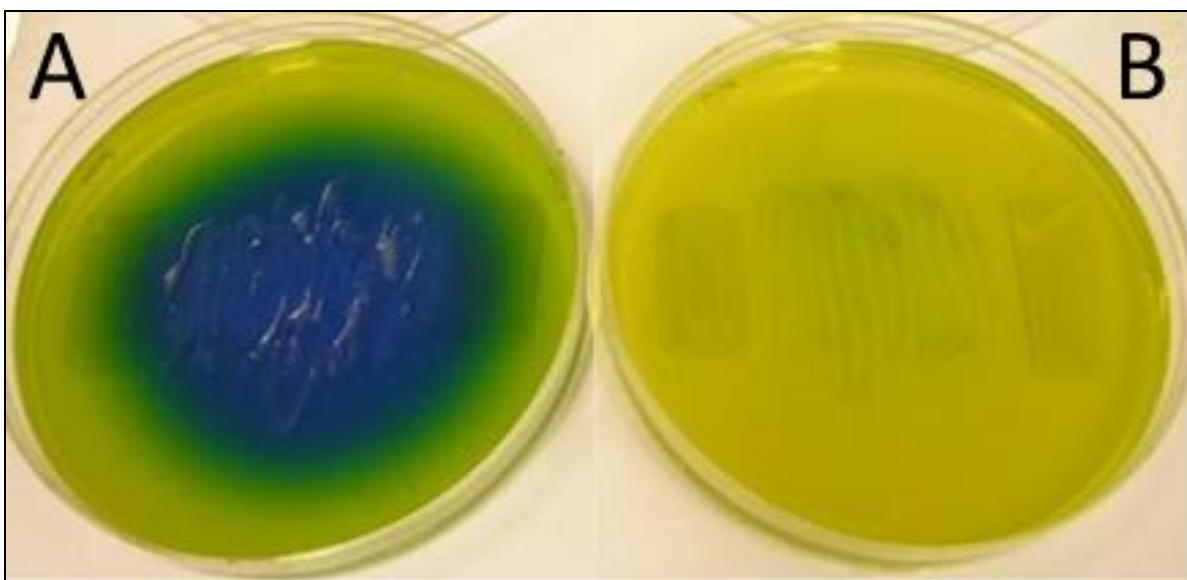


Figura 5 - Crescimento de *Cryptococcus spp.* em ágar CGB
C. gattii (A) e *C. neoformans* (B) em ágar CGB
Fonte: Adaptado de KLEIN et al., 2009

As provas bioquímicas utilizadas em rotina laboratorial consistem na realização do teste manual da urease (Figura 6) ou a partir de testes automatizados, que podem analisar

simultaneamente uma série de compostos, inclusive a urease, como: glicose, L-sorbose, galactose, D-ribose, D-xylose, L-arabinose, D-arabinose, L-ramnose, salicina, melibiose, sacarose, alfa-metila-D-glucósido, o inositol, a maltose, trealose, celobiose, lactose, rafinose, D-Glucitol, ribitol, eritritol, glicerol, melezitose, D-manitol, galactitol, D-L-ácido láctico e ácido succínico (ST GERMAIN & BEAUCHESNE, 1991; SOUZA et al., 2001; MASSONET et al., 2004; MELHEM et al., 2013).

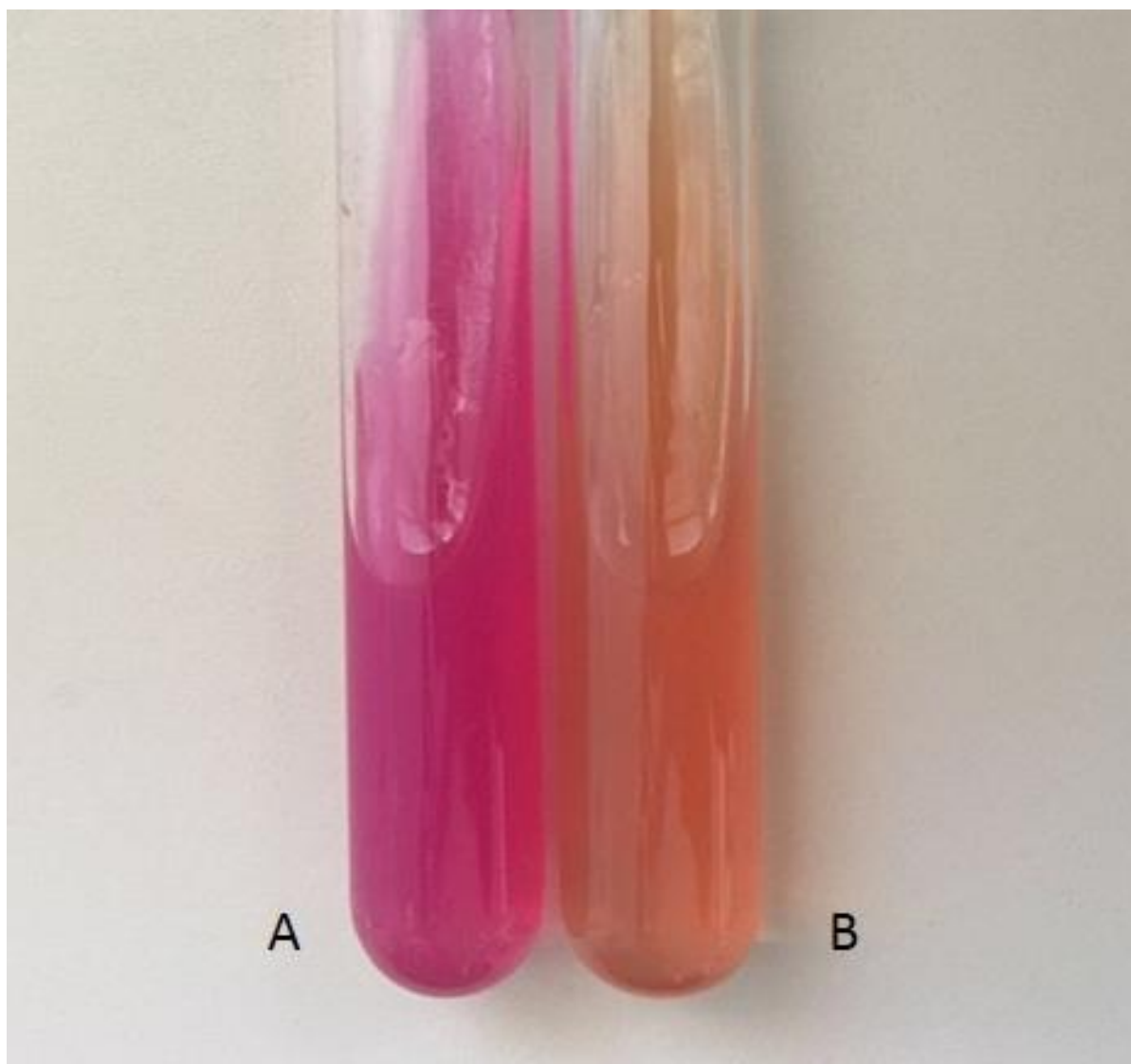


Figura 6 - Identificação bioquímica de *Cryptococcus* spp. em meio ureia-ágar-base
No tubo A há produção de urease (reação positiva) e no tubo B não há produção (reação negativa)

Ainda é possível a realização de testes sorológicos, já que, durante a infecção por *Cryptococcus* spp., há a presença de antígenos capsulares polissacarídicos solúveis em fluidos corporais, como soro e Líquido Cefalorraquidiano (LCR), e podem ser detectados com a utilização de anti-soro específico em técnicas distintas como aglutinação em látex, *Enzyme-*

linked Immunosorbent Assay (ELISA), imunodifusão radial e imunocromatografia (QUEIROZ et al., 2008; SEVERO et al., 2009).

Outra metodologia empregada na identificação é a espectrometria de massa do tipo *Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF), uma importante tecnologia, que vem revolucionando a prática da microbiologia como um todo (MARTINY et al., 2012), a partir da análise dos padrões de proteínas. As colônias isoladas e puras de *Cryptococcus* spp. são adicionados a uma matriz polimérica formando uma mistura, que é aplicada a um suporte. Este é irradiado com laser, havendo ionização e condução dos íons para o tubo do espectrômetro de massa, com posterior cálculo do tempo de voo e separação a partir da carga e massa, formando espectros de proteínas características para cada micro-organismo (MCTAGGART et al., 2011; DE CAROLIS et al., 2014).

Os métodos moleculares representam potenciais ferramentas de diagnóstico, por apresentarem alta especificidade, no entanto, o uso destes métodos na rotina clínica laboratorial é limitado, devido à falta de padronização, difícil validação e *expertise* elevada exigida por parte dos profissionais envolvidos (ARVANITIS et al., 2014).

Vários procedimentos têm sido propostos para detectar e diferenciar espécies de *Cryptococcus*, incluindo métodos de hibridação de ácidos nucleicos (SAMBROOK et al. 1989; SPITZER & SPITZER, 1992) e técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR), como: PCR multiplex que se fundamenta no uso de *primers* específicos para a amplificação de regiões conservadas; PCR *nested* que utiliza pares de *primers* para amplificação do DNA (NEPPELENBROEK et al., 2014); PCR em tempo real (qPCR), que requer uma única corrida sem a necessidade de gel de ágarose para a análise, utilizando-se a amostra primária, minimizando-se as chances de contaminação (VERON et al., 2009); RFLP que baseia-se na caracterização de sítios de restrições (PINCUS et al., 2007); AFLP, que consiste em uma amplificação seletiva a partir de fragmentos de restrição do material genômico e MLST, que é uma tipagem de sequência multilocus (BOEKHOUT et al., 2001; LATOUCHE et al., 2003).

Outros exames a serem realizados em menor escala são os histopatológicos para visualização do micro-organismo, nos quais, os cortes histológicos podem ser corados por hematoxilina-eosina, mucicarmim de Meyer, ácido periódico Schiff (PAS), método de Gomori-Grocott e Fontana-Masson (LAZERA et al., 2004; PEDROSO & CANDIDO, 2006).

1.7 Tratamento

No tratamento da criptococose, a escolha do antifúngico está relacionada ao sítio de infecção e as características imunológicas do paciente (SEVERO et al., 2011). Os agentes antifúngicos disponíveis para o tratamento, correspondem a anfotericina B e suas diferentes formulações (poliênicos); fluconazol (triazólico) e 5-fluorocitosina ou flucitosina (análogos de pirimidina) (ZAITZ et al., 2010; MCCARTY & PAPPAS, 2015).

Em função de suas toxicidades aguda e crônica existentes e na tentativa de melhorar sua eficácia terapêutica, diferentes formulações de anfotericina B vem sendo desenvolvidas e estão atualmente disponíveis como a anfotecina B liposomal ou lipossômica, complexo lipídico de anfotericina B e dispersão coloidal de anfotericina B (DORA & SOUZA, 2005; GOVENDER et al., 2013).

Este agente antifúngico interage de forma específica com o ergosterol, constituinte da parede celular fúngica, e leva à formação de poros através das membranas lipídicas (FILIPPIN & SOUZA, 2006), os poros formados danificam a membrana e alteram a permeabilidade celular, promovendo o extravasamento de componentes citoplasmáticos e posteriormente a morte celular (BAGINSKI & CZUB, 2009).

Entretanto, formas de resistências a este antifúngico sugerem que as possíveis causas de resistência à anfotericina B podem estar relacionadas à ausência total de ergosterol na membrana fúngica e a presença de estruturas diferentes do ergosterol, que impossibilitam a ligação com os poliênicos (MORACE et al., 2014).

Os triazólicos apresentam atividade fungicida ou fungistática baseada na inibição da esterol-14- α -desmetilase, prejudicando a síntese do ergosterol na membrana citoplasmática e levando ao acúmulo de 14- α -metilesteróis, que não possuem a mesma forma e propriedades físicas que o ergosterol. Com isso ocorre a formação de uma membrana alterada, que não desempenha as funções exigidas para o desenvolvimento do fungo (BERGOLD & GEORGIADIS, 2004). Os triazólicos apresentam a vantagem de causar menos reações adversas do que a anfotericina B, entretanto possuem menor potência. Contudo, a sua utilização excessiva ocasionou o aparecimento de formas de resistência em espécies até então suscetíveis (SANTOS, et al., 2014). Essas formas de resistência podem ser explicadas por mecanismos de indução de bombas de efluxo, que levam à diminuição da concentração da droga antifúngica no alvo terapêutico (SANGUINETTI et al., 2015); de inibição e/ou superexpressão do gene *ERG11*, reduzindo a afinidade entre os azólicos e os sítios

enzimáticos específicos (MORACE et al., 2014); e de mutação do gene *ERG3*, que impede a conversão do 14- α -metil-3,6-diol para 14- α -metilfecosterol com a substituição do ergosterol por fecosterol, bloqueando a ação do antifúngico na membrana (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006).

A flucitosina ou 5-fluorocitosina (5-FC) é uma alternativa terapêutica que promove efeitos fungistáticos e fungicidas sobre diversos gêneros, como *Cryptococcus*, *Candida* e *Aspergillus*. A flucitosina é uma pirimidina que após sua administração transforma-se, dentro da célula fúngica, em 5-fluoruracil e depois em 5-fluordesoxiuridina. Esse último comporta-se como um antimetabólito que interfere na biossíntese normal dos ácidos nucleicos e nucleotídeos fundamentais para o desenvolvimento do fungo. Tal fármaco é absorvido por via digestiva, distribuindo-se e atingindo o SNC e o LCR, (GHANNOUM & RICE, 1999; MORACE et al., 2014), podendo ser usado de maneira sinérgica com anfotericina B, para pacientes com infecções fúngicas sistêmicas (FLEVARI et al., 2013), entretanto deve se levar em consideração seu efeito mielotóxico.

Os mecanismos de resistência para 5-FC baseiam-se nas múltiplas enzimas intracelulares requeridas para a sua ação como a mutação ou perda da atividade da permease codificada pelo gene *FCy2*; modificação na enzima citosina deaminase codificada pelo gene *FCy1* e alteração na enzima UMP-pirofosforilase, codificada pelo gene *FURI* (CHAPELAND-LECLERC et al., 2005).

Contudo, a aplicação de metodologias que permitam a determinação das diversidades genômicas das espécies de *Cryptococcus* spp. e a investigação de mecanismos de virulência associados a estas espécies tem aumentado, com propósito de identificar novos alvos terapêuticos no combate da criptococose (BAHN & JUNG, 2013).

A partir dessas informações percebe-se que o número de opções terapêuticas disponíveis é bastante limitado frente a gravidade e relevância da criptococose para a saúde pública. Soma-se a isso os efeitos colaterais associados a anfotericina-B e 5-fluorocitosina e o aparecimento de resistência clínica ao uso de triazólicos ou com Concentração de Inibição Mínima (CIM) elevada, que dificultam cada vez mais as possibilidades de tratamento (FRIESE et al., 2001; ESPINEL-INGROFF et al., 2012a).

As falhas no tratamento também podem estar associadas a atrasos e erros no diagnóstico, assim como a falta de antifúngicos nas unidades hospitalares (BICANIC et al., 2007; DROMER et al., 2008; NUCCI & PERFECT, 2008).

Diante destas circunstâncias, estratégias farmacológicas vêm sendo utilizadas, representadas pela produção de novas formulações de antifúngicos, combinações terapêuticas entre os antifúngicos disponíveis e também terapias alternativas usando princípios ativos obtidos de fontes naturais, materiais sintéticos e materiais poliméricos (SPAMPINATO & LEONARDI, 2013).

1.8 *Eugenia dysenterica* (Mart.) DC

Eugenia dysenterica (Mart.) DC é uma espécie vegetal pertencente à família Myrtaceae, utilizada como fonte de alimento e para fins medicinais. É uma árvore frutífera que está distribuída em toda a extensão do cerrado, incluindo várias unidades federativas brasileiras, predominando na Bahia, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí, São Paulo e Tocantins (LORENZI et al., 2002; BRITO et al., 2003; MAZUTI SILVA et al., 2015).

Stenocalyx dysenterica, *Stenocalyx dysentericus* (Mart. Ex DC.) Berg e *Myrtus dysenterica* Mart são consideradas sinonímias botânicas (ALMEIDA et al., 1998). Já cagaita e cagaiteira são nomes populares que fazem referência ao efeito laxativo vinculado ao seu fruto (OLIVEIRA et al., 2012).

Visualmente, sua árvore quando adulta pode chegar a 8 metros de altura, 15 metros de amplitude e uma copa de 8 metros. A copa é alongada e densa, com ramos quadrangulares e glabros. Os botões, pedicelos, ramos jovens e folhas são dotados de diminutos pelos (MARTINOTTO et al., 2008).

As flores são brancas (Figura 7- A), odorizadas, solitárias, tretâmeras ou pentâmeras, dialipétalas e dialisépalas, elípticas; com cerca de 2 cm de diâmetro; possui muitos estames, apresentando estilite filiforme e estigma simples (PINA, 2008; FARIA JÚNIOR, 2010).

As folhas são descritas como membranáceas, de tamanho estimado entre 3 a 14 cm de comprimento e cerca de 1 a 8 cm de largura, aromáticas, simples, oposta-cruzadas, ovada-elípticas e elípticas a oblongo-elípticas (SILVA et al., 2001).

Os frutos são de coloração verde quando jovens e amarelo quando maduros (Figura 7 - B). Apresentam casca fina e são considerados frutos do tipo baga, de formato globoso e levemente achatado. São suculentos, carnosos, brilhantes, com cerca de 90 % de água e de sabor acidificado e ímpar (PROENÇA & GIBBS, 1994; CAMILO et al., 2014).

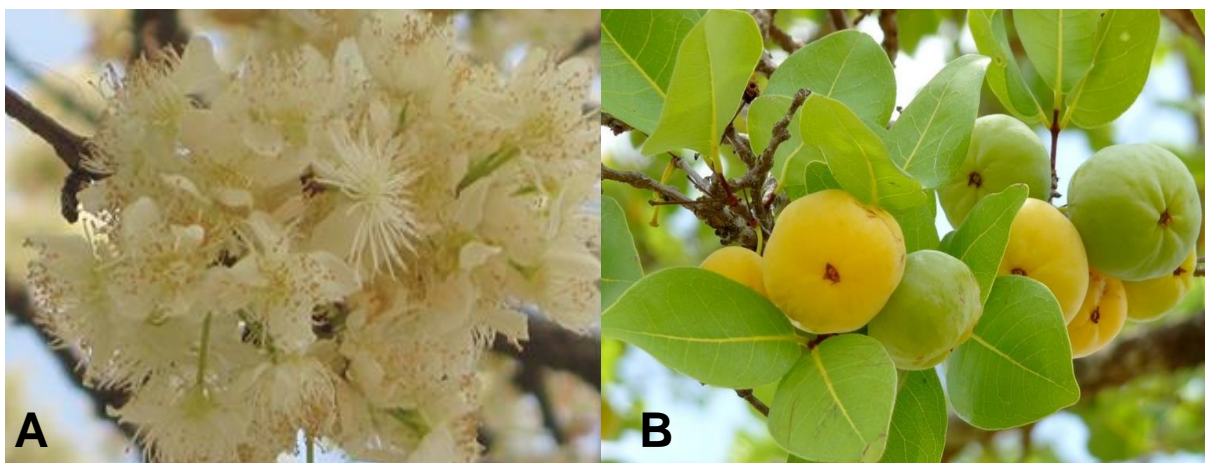


Figura 7. Flores (A) e frutos (B) de *Eugenia dysenterica*
Fonte: Adaptado de DUBOC & GUERRINI, 2007

Em relação aos constituintes químicos percebe-se uma grande variedade, nos quais destacam-se taninos, flavonoides, terpenos e saponinas no extrato etanólico de folhas de cagaita (CECÍLIO et al., 2012). Em frutos foram encontrados ácido gálico, compostos fenólicos (catequinas e procianidinas) e carotenóides. Além destes, em óleos essenciais foram encontradas substâncias como: β -cariofileno, α -humuleno, limoneno, α -tujeno, α -terpineol e óxido de β -cariofileno, α -pineno, (Z)- β ocimeno, (E)- β -ocimeno, e γ -cadineno (COSTA et al., 2000; DUARTE et al., 2010; SOUSA et al., 2012).

As atividades biológicas dos extratos de folhas de *E. dysenterica* apresentam propriedades antidiarréica (LIMA et al., 2011), antioxidante, gastroprotetora associada à inibição da produção de ácido clorídrico (PRADO et al., 2014), atividades antiviral (CECÍLIO et al., 2012), inibitória em relação α -amilase e α -glucosidase (SOUSA et al., 2012) e antifúngica (COSTA et al., 2000).

A atividade antifúngica evidenciada por Costa e cols. (2000) demonstrou que óleos essenciais de *E. dysenterica* foram ativos contra oito cepas de *Candida albicans*, 35 cepas de *C. neoformans* e duas de *C. gattii*, na qual, o resultado mais significativo foi contra as cepas de *Cryptococcus*. Em estudo recente do nosso grupo, Correia e cols. (2016) também mostraram alto efeito inibitório de extrato aquoso de folhas *E. dysenterica* contra espécies de *Candida* não *albicans*, entre elas *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. famata*. Tendo em vista o potencial antifúngico de *E. dysenterica* contra microorganismos fúngicos e diante das poucas opções terapêuticas convencionais e dos seus elevados grau de toxicidade, e o fato de nem sempre haver resolutividade nos tratamentos de criptococose, a procura por produtos oriundos de plantas medicinais apresenta-se como relevante realidade, que deve ser melhor estudada.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar isolados clínicos de *Cryptococcus* spp, demonstrando as características fenotípicas e genotípicas das diferentes espécies e avaliar o perfil de susceptibilidade aos agentes antifúngicos convencionais e ao extrato aquoso bruto de *Eugenia dysenterica*.

2.2 Objetivos Específicos

Identificar espécies de *Cryptococcus* spp., por métodos clássicos morfológicos e bioquímicos.

Confirmar a identificação das espécies de *Cryptococcus* spp através do gene URA5 utilizando método molecular PCR-RFLP.

Verificar a acurácia da técnica de espectrometria de massas *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight* (MALDI-TOF) para identificação das espécies de *Cryptococcus* spp.

Determinar o perfil de susceptibilidade de *Cryptococcus* spp. frente à antifúngicos comerciais.

Testar extrato bruto de *Eugenia dysenterica* contra *Cryptococcus* spp. por método de Concentração Inibitória Mínima (CIM).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização microbiológica

3.1.1 Amostras

Foram analisados 20 isolados de *Cryptococcus* spp. provenientes de cultivo de líquido cefalorraquidiano (LCR) (n=15), sangue (n=2), lavado broncoalveolar (n=1), fragmento de pele (n=1) e aspirado traqueal (n=1), oriundos de pacientes com suspeita de micose sistêmica, atendidos nas unidades de saúde da rede pública do Distrito Federal. O processamento das amostras biológicas foi realizado pelo Laboratório de Micologia do Núcleo de Parasitologia e Micologia (NPM) do Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF). Este estudo foi aprovado pelo parecer nº 1.385.224 do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (CEP/FS-UnB) (ANEXO 1).

Tabela 2 – Isolados clínicos de pacientes com suspeita de micoses sistêmicas

Amostras biológicas	Número	%
Líquido cefalorraquidiano	15	75
Sangue	2	10
Lavado broncoalveolar	1	5
Fragmento de pele	1	5
Aspirado traqueal	1	5
Total	20	100

3.1.2 Exame direto

A presença de *Cryptococcus* spp. nas amostras de LCR foi detectada por microscopia óptica com aumento de 400 X, por meio de montagem em lâmina com tinta nanquim, que permitiu a visualização da cápsula, devido a exclusão do corante, formando área clara ao redor da célula leveduriforme oriundas de LCR. Para as outras amostras biológicas, sangue, lavado broncoalveolar, fragmento de pele e aspirado traqueal, as células leveduriformes foram detectadas utilizando solução de hidróxido de potássio (KOH) a 20 %, como reagente digestor e clarificante (ZAITZ et al., 2010; LARONE, 1995).

3.1.3 Isolamento fúngico

A obtenção dos isolados foi feita a partir de cultivos das amostras biológicas a 25 °C (± 2 °C) em tubos de ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (HiMedia, Mumbai, Índia), ágar Níger (HiMedia, Mumbai, Índia) e ágar Littman (HiMedia, Mumbai, Índia) e a 37 °C em ágar Fava Neto. O crescimento leveduriforme foi observado em até 72 horas (LARONE, 1995).

3.1.4 Conservação dos isolados clínicos

Os isolados foram conservados em criotubos de 2,0 mL, em solução aquosa de glicerina a 10 % e conservados à temperatura de 20 °C negativos, possibilitando posterior recuperação e processamento dos microrganismos fúngicos (NEUFELD, 1999).

3.1.5 Testes bioquímicos manuais

Para a realização dos testes bioquímicos, os isolados congelados foram subcultivados em tubos de ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (HiMedia, Mumbai, Índia) a 25 °C por 24 a 48 horas de incubação, até que ocorresse crescimento adequado (LARONE, 1995). Colônias frescas e puras obtidas foram inoculadas em tubos de ágar Níger, ágar uréia e placas de ágar CGB e incubadas novamente a 25 °C por 24 a 48 horas, a fim de detectar no ágar niger a formação de colônias escurecidas, indicativas de produção de melanina, em ágar uréia a produção de urease e ágar CGB a assimilação de glicina (KLEIN et al, 2009).

Tabela 3 – Teste de identificação bioquímica para *Cryptococcus* spp.

Testes bioquímicos	Produto de reação	Indicador de coloração
Ágar Níger	Produção de melanina	Colônias escurecidas (reação positiva) Colônias cremes (reação negativa)
Ágar uréia	Produção de urease	Colônias róseas (reação positiva) Colônias cremes (reação negativa)
Ágar CGB	Assimilação de glicina	Colônias azuis (reação positiva) Colônias amarelas (reação negativa)

3.1.6 Testes bioquímicos automatizados

Foram utilizados cartões de identificação para leveduras do sistema VITEK® 2 Compact (BioMérieux®, França) constituídos por 46 testes colorimétricos, que envolvem reações de assimilação de carboidratos (20), ácidos orgânicos (6) e nitrato (1); reações de oxidase (8), aril-amidase (9), fosfatase (1) e urease (1).

Para a preparação dos cartões de identificação foram realizados subcultivos, com os isolados, em tubos de ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (HiMedia, Mumbai, Índia) a 25 °C por 24 a 48 horas de incubação, até que ocorresse crescimento adequado (LARONE, 1995). Em seguida, colônias foram suspensas em solução salina estéril (NaCl aquoso de 0,45 a 0,50 %, pH 4,5 a 7,0) em tubos (75 X 12 mm) de poliestireno transparente, até a obtenção de solução com densidade equivalente a 2,0 da escala de Mc Farland. Para isto foi utilizado o calibrador VITEK® 2 DensiChek (BioMérieux®, França), medidor de turbidez.

Os tubos e os cartões foram dispostos em suportes de amostras (*racks*) e estas inseridas na plataforma VITEK® 2 Compact (BioMérieux®, França) com a finalidade de distribuir a suspensão do inóculo fúngico entre os poços dos cartões, que foram selados e incubados a 35,5 °C por até 18 horas, para leituras ópticas feita automaticamente a cada 15 min. A partir destas leituras, perfis de identificação foram estabelecidos e interpretados de acordo com um algoritmo específico, proporcionando identificação do organismo desconhecido e classificando as identificações finais como: "excelente", "muito bom", "bom", "aceitável" ou "baixa discriminação" (HATA et al., 2007).

3.1.7 Método molecular PCR-RFLP

A técnica de PCR-RFLP foi realizada no Laboratório de Micologia do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) da Universidade Nova de Lisboa (UNL), Portugal.

3.1.7.1 Extração do DNA do *Cryptococcus* spp.

Foram realizados subcultivos dos isolados de *Cryptococcus* spp. em tubos de ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (HiMedia, Mumbai, Índia) a 25 °C por 24 a 48 horas de incubação, até que ocorresse crescimento adequado (LARONE, 1995). Em seguida as colônias de leveduras foram transferidas para um microtubo de 1,5 mL contendo um volume

de 200 µL de esferas de vidro (0,4-0,6 mm de diâmetro) e 500 µL de Tampão de Lise (Tris 50 mM, NaCl 250 mM, EDTA 50 mM, SDS 0,3 % (p/v), pH 8). Em seguida, esse microtubo foi agitado em vórtex durante 3 minutos continuamente, até a formação de uma suspensão celular densa.

No passo seguinte, o microtubo foi colocado em banho-maria a 65 °C durante 1 h, e posteriormente a suspensão fúngica foi novamente agitada no vórtex durante 3 min e centrifugada por 10 min a 11 000 g. Após a centrifugação, o sobrenadante que contém o DNA foi separado para um novo microtubo, e congelado a – 20 °C até a realização da técnica de PCR-RFLP.

3.1.7.2 Método de PCR-RFLP

Para a realização da técnica de PCR-RFLP inicialmente foi realizada uma diluição de 1:750 em tampão Tris-HCl do DNA fúngico extraído, e para padronizar a concentração de DNA foi realizada uma purificação, seguida de quantificação em espectrofotômetro NANODROP ND-100 (Thermoscientific, Waltham, EUA) e um ajuste para a concentração 50 ng do DNA desejada. A qualidade do DNA extraído foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL).

O gene *URA5* foi amplificado em 50 µL, contendo: 50 ng DNA, tampão PCR 1x (10mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂), 0,2 mM de cada dATP, dCTP e dTTP, 3mM MgAc, 1,5 U Taq DNA polimerase, e 50 ng de cada primer: *ura5 fold* (5' ATGCCTCCCAAGCCTCGACTCCG3') e *ura5 reverse* (5' TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC3').

A ciclagem foi realizada usando termociclador com: 1 ciclo de 94 °C por 3 min, 35 ciclos de 94 °C por 45 s, 61 °C por 1 min, e 72 °C por 10 min, seguido de um ciclo de 72 °C por 10 min. Os produtos da amplificação no PCR foram digeridos com Saup8I e Hhat por 3h ou *overnight* e separados em gel de agarose 3 % por eletroforese empregando 100 v por 5h.

Para otimizar a técnica de PCR-RFLP quanto à tipificação de isolados de *Cryptococcus* spp., foram empregadas cepas de referência correspondentes aos 8 tipos moleculares descritos na tabela 4.

Tabela 4 – Cepas de referência do complexo *Cryptococcus* spp.

Espécie referência	Espécie identificada	Origem
WM148 (=CBS 10085)	<i>Cryptococcus neoformans</i> (tipo molecular VNI)	LCR, Austrália (sorotipo A)
WM626 (=CBS 10084)	<i>Cryptococcus neoformans</i> (tipo molecular VNII)	LCR, Austrália (sorotipo A)
WM629 (=CBS 10079)	<i>Cryptococcus neoformans</i> (tipo molecular VNIV)	Sangue, Austrália (sorotipo D)
WM628 (=CBS 10080)	<i>Cryptococcus neoformans</i> (híbrido - tipo molecular VNIII)	LCR, Austrália (sorotipo AD)
WM179 (=CBS 10078)	<i>Cryptococcus gattii</i> (tipo molecular VGI)	LCR, Austrália (sorotipo B)
WM178 (=CBS 10082)	<i>Cryptococcus gattii</i> (tipo molecular VGII)	Pulmão, Austrália (sorotipo B)
WM161 (=CBS 10081)	<i>Cryptococcus gattii</i> (tipo molecular VGIII)	<i>Eucalyptus debris</i> , Estados Unidos (sorotipo B)
WM161 (=CBS 10101)	<i>Cryptococcus gattii</i> (tipo molecular VGIV)	Guepardo, África do Sul (sorotipo C)
CN137 (=PYCC 3957 CBS 132)	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Suco de fruta fermentado (híbrido AD)

Fonte: Laboratório de Micologia, IHMT

3.1.8 Espectrometria de massa

As espécies de *Cryptococcus* foram analisadas por espectrometria de massa na estação de preparação Vitek MS (BioMérieux®, França). Para isto, colônias dos isolados de *Cryptococcus* spp., subcultivados em tubo de ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (HiMedia, Mumbai, Índia) a 25 °C por 24 a 48 horas de incubação, foram aplicadas em *spots* do suporte para inoculação/identificação (BioMérieux®, França) e, em seguida tratadas com 0,5 µL de ácido fórmico (25% [vol / vol] - BioMérieux®, França). Após secagem à temperatura ambiente, 1 µL de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (3.1 % [peso / vol]) - BioMérieux, França) foi adicionado e novamente sofreu processo de secagem à temperatura ambiente antes da análise por espectrometria de massa (KIM et al., 2014).

O suporte de inoculação/identificação foi inserido na estação de leitura e a identificação fúngica foi obtida por meio de espectros. Os espectros formados foram comparados com espectros padrões armazenados nos bancos de dados MYLA® (BioMérieux®, França) e *Spectral Archive and Microbial Identification System* (SARAMIS)

(Shimadzu®, Japão). Esta comparação é realizada por meio de sobreposição de picos, capazes de caracterizar espécie, gênero ou família dos micro-organismos, resultando em probabilidade relativa da identificação (KIM et al., 2014).

Foram considerados válidos o percentual de probabilidade de identificação igual ou maior de 85 %. Como controle positivo foi utilizado cepa de referência de *Escherichia coli* ATCC 8739 (KIM et al., 2014).

3.2 Determinação do perfil de susceptibilidade de *Cryptococcus* spp.

3.2.1 Agentes antifúngicos

Foram utilizados os cartões de sensibilidade fúngica AST-YS07 (BioMérieux®, França) no sistema VITEK® 2 Compact (BioMérieux®, França), a fim de determinar as sensibilidades aos seguintes agentes antifúngicos: Anfotericina B (AB), Fluconazol (FLU) e Flucitosina (FCT).

3.2.2 Preparo do inóculo fúngico

A partir de subcultivos dos isolados fúngicos, em tubos de ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (HiMedia, Mumbai, Índia) a 25 °C por 24 a 48 horas de incubação, foram preparados inóculos fúngicos. Para isto, colônias foram suspensas em 3,0 mL de solução salina estéril (NaCl aquoso de 0,45 a 0,50 %, pH 4,5 a 7,0) contidas em tubos (75 x 12 mm) de poliestireno transparente, até obter uma suspensão equivalente a 2,0 da escala de Mc Farland. Para isto foi utilizado o calibrador VITEK® 2 DensiChek (BioMérieux®, França), medidor de turbidez.

3.2.3 Leitura e interpretação dos resultados

Os cartões foram carregados com as respectivas suspensões de leveduras que foram diluídas adequadamente pelo equipamento. Após o preenchimento, os cartões foram incubados, ocorrendo a leitura automaticamente. O tempo de incubação variou de 9,1 a 27,1 h (tempo médio de 18,1 h), com base na taxa de crescimento microbiano. Os resultados foram expressos como valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL.

Os resultados de CIM obtidos no sistema VITEK® 2 Compact foram comparadas com os *Epidemiologic Cutoff Value* (ECV), pois até o momento, não há breakpoints estabelecidos para antifúngicos contra *Cryptococcus* spp. Os valores de *breakpoints* foram baseados a partir de dois estudos de Espinel-Ingroff e cols. (2012a e 2012b).

3.3 Avaliação da atividade antifúngica do extrato aquoso de *Eugenia dysenterica*

3.3.1 Material botânico

Para o teste de atividade antifúngica foi utilizado extrato aquoso das folhas de *Eugenia dysenterica*, pertencente a família Myrtaceae, obtido da região do Cerrado e entorno de Brasília, Distrito Federal. Esta espécie foi identificada e depositada em excicata, *voucher* 914 (UnB), pelos professores Christopher William Fagg e Suelí Maria Gomes, no Herbário da Universidade de Brasília.

3.3.2 Extração botânica

As folhas de *E. dysenterica* após secagem em temperatura ambiente, foram pulverizadas em moinho de facas e extraídas por infusão, utilizando 400 g do material botânico e 3L de água destilada. Após filtração, a parte líquida foi removida por liofilização (SOUZA, et al., 2012). Os extratos utilizados neste trabalho foram cedidos gentilmente pelo Grupo de Pesquisa, Desenvolvimento, Produção e Controle da Qualidade de Medicamentos e foram produzidos pelo Laboratório de Produtos Naturais (LPN) da Universidade de Brasília (UnB).

3.3.3 Concentração Inibitória Mínima

3.3.3.1 Preparação do meio de cultura

Foi utilizado RPMI-1640 suplementado com glutamina, vermelho de fenol, sem bicarbonato. Foi adicionado 3-(*N*-morpholimo) ácido propanosulfônico (MOPS) e ajustado em pH 7,0. A esterilização do meio foi realizada por filtração e sua conservação mantida em 4°C.

3.3.3.2 Preparo do inóculo fúngico

O inóculo fúngico foi obtido por meio de subcultivo dos isolados de *Cryptococcus* spp. em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (HiMedia, Mumbai, Índia) à 25 °C (\pm 2 °C) por 24 a 48 horas. Para isto, foram suspensas colônias em 3,0 mL de solução salina estéril 0,45 %, contidas em tubos de ensaios, até obter uma suspensão equivalente a 0,5 da escala de McFarland. A leitura do inóculo fúngico foi realizada utilizando o medidor de turbidez VITEK® 2 DensiChek (BioMérieux®, França).

Após preparação desta suspensão padrão procedeu-se diluições de 1:50 seguida de uma diluição 1:20 ambas em caldo RPMI-1640.

Após as diluições, foi adicionado ao inóculo fúngico 15 μ L de solução aquosa de resazurina estéril à 20 μ g/mL, a fim de revelar o crescimento fúngico por meio de mudança de coloração, de azul (ausência de crescimento fúngico) a rosa (presença de crescimento fúngico) (MANJUAN et al., 2007).

3.3.3.3 Preparação da solução estoque

A solução estoque do extrato de *E. dysenterica* e do controle positivo a fluconazol foram preparados em dimetilsulfóxido (DMSO) a 1 % com concentração final de 100 mg/mL e 2 mg/mL, respectivamente (MANJUAN et al., 2007).

3.3.3.4 Preparação da placa

Para o teste de microdiluição foram utilizadas placas de 96 poços. Inicialmente, foi adicionado 100 μ L do caldo RPMI 1640 em cada poço. Em seguida diluições seriadas de 1:2 foram realizadas com solução estoque do extrato aquoso iniciando com concentração de 50.000 μ g/mL e concentração final de 24,41 μ g/mL. Diluições seriadas de 1:2 também foram realizadas para o controle positivo (fluconazol), cuja concentração inicial foi de 1000 μ g/mL e final de 0,976 μ g/mL. Posteriormente 100 μ L do inóculo fúngico foi adicionado em cada poço. Controles de esterilidade e crescimento foram realizados, utilizando-se o caldo RPMI 1640 e caldo RPMI 1640 com microrganismos do gênero *Cryptococcus*, respectivamente. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas (MANJUAN et al., 2007).

3.3.4 Leitura e interpretação dos resultados

A leitura foi realizada por visualização da mudança de coloração dos poços. Para este estudo, a CIM foi interpretada como a menor concentração que manteve sua coloração inicial (azul), indicando ausência de crescimento ou a primeira diluição que sofreu alteração de azul para sutilmente rosa, equivalente a inibição proeminente do crescimento (MANJUAN et al., 2007).

Em função da coloração escura do extrato de *E. dysenterica*, não foi possível a leitura da absorvância em leitoras de placas convencionais. Tal limitação foi suprimida com a realização de semeios em ágar Sabouraud de alíquotas provenientes dos poços da placa para verificação de crescimento fúngico.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Características microbiológicas dos isolados clínicos

No exame direto (Tabela 5), utilizando tinta nanquim e KOH a 20 %, os isolados de *Cryptococcus* spp. foram caracterizados como estruturas celulares arredondadas com ou sem brotamento. A utilização de tinta nanquim no líquido cefalorraquidiano permitiu também a observação de estrutura capsular, importante fator de virulência, inerente as espécies de *Cryptococcus* (Figura 8).

Tabela 5 - Características microscópicas das amostras biológicas por exame direto

Amostras biológicas	Características microscópicas	
	Tinta nanquim	KOH a 20%
Líquido cefalorraquidiano	Células arredondadas com ou sem brotamento encapsuladas	Exame não realizado
Sangue		
Lavado broncoalveolar	Exame não realizado	Células arredondadas com ou sem brotamento
Fragmento de pele		
Aspirado traqueal		

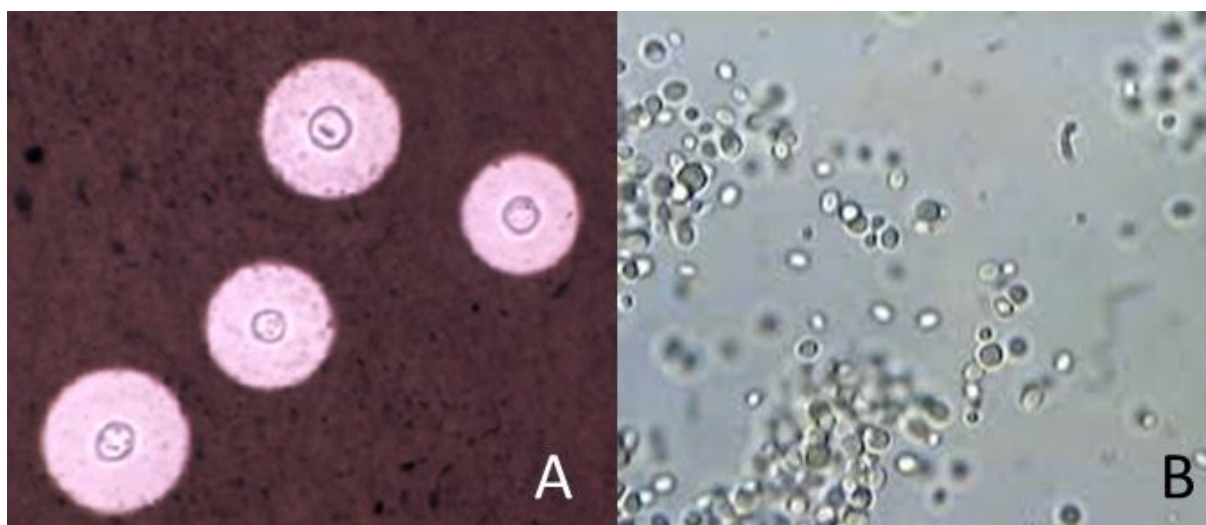


Figura 8 - Visualização microscópica de *Cryptococcus* spp. Análises em Tinta naquim (A) e KOH (B)

Na identificação macroscópica, todos os isolados apresentaram colônias com características morfológicas de *Cryptococcus* spp., com aspecto mucóide, brilhante, úmido e com coloração inicialmente creme no ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol, ágar Littman e no ágar Fava Neto, e coloração enegrecida em ágar Níger.

Colônias enegrecidas no ágar Níger, foram demonstradas por todos os isolados (n=20). Esta característica de produzir melanina a partir da reação entre fenol oxidase,

produzida pelo micro-organismo, com ácido cafeico presente no meio, é típica de espécies de *Cryptococcus neoformans* ou *Cryptococcus gattii* e permite a diferenciação destas espécies com outras espécies de *Cryptococcus* (KLEIN et al., 2009).

A produção de urease no meio ágar uréia também ocorreu em todos os isolados (n=20), corroborando com a caracterização das espécies do gênero *Cryptococcus*, uma vez que, outras espécies de levedura, como por exemplo espécies do gênero *Trichosporon* e algumas espécies do gênero *Candida* são urease negativa (KLEIN et al., 2009).

Embora os meios ágar Níger e ágar uréia auxiliam na caracterização do gênero *Cryptococcus*, estes não possibilitam a diferenciação entre as espécies de *Cryptococcus*. Neste caso, foi utilizado o ágar CGB, que é um efetivo meio de diferenciação entre as duas principais espécies de interesse clínico, *C. neoformans* e *C. gattii*.

No ágar CGB, 8 isolados assimilaram glicina, sendo caracterizado como *Cryptococcus gattii* e 12 isolados não assimilaram glicina e foram identificados como *Cryptococcus neoformans*.

Tabela 6 - Resultados dos testes bioquímicos manuais

Identificação	Número de isolados clínicos	Número (%) de isolados positivos		
		Produção de melanina	Produção de urease	Assimilação de glicina
<i>C.gattii</i>	8	8/8 (100 %)	8/8 (100 %)	8/8 (100 %)
<i>C. neoformans</i>	12	12/12 (100 %)	12/12 (100 %)	0/12 (0 %)

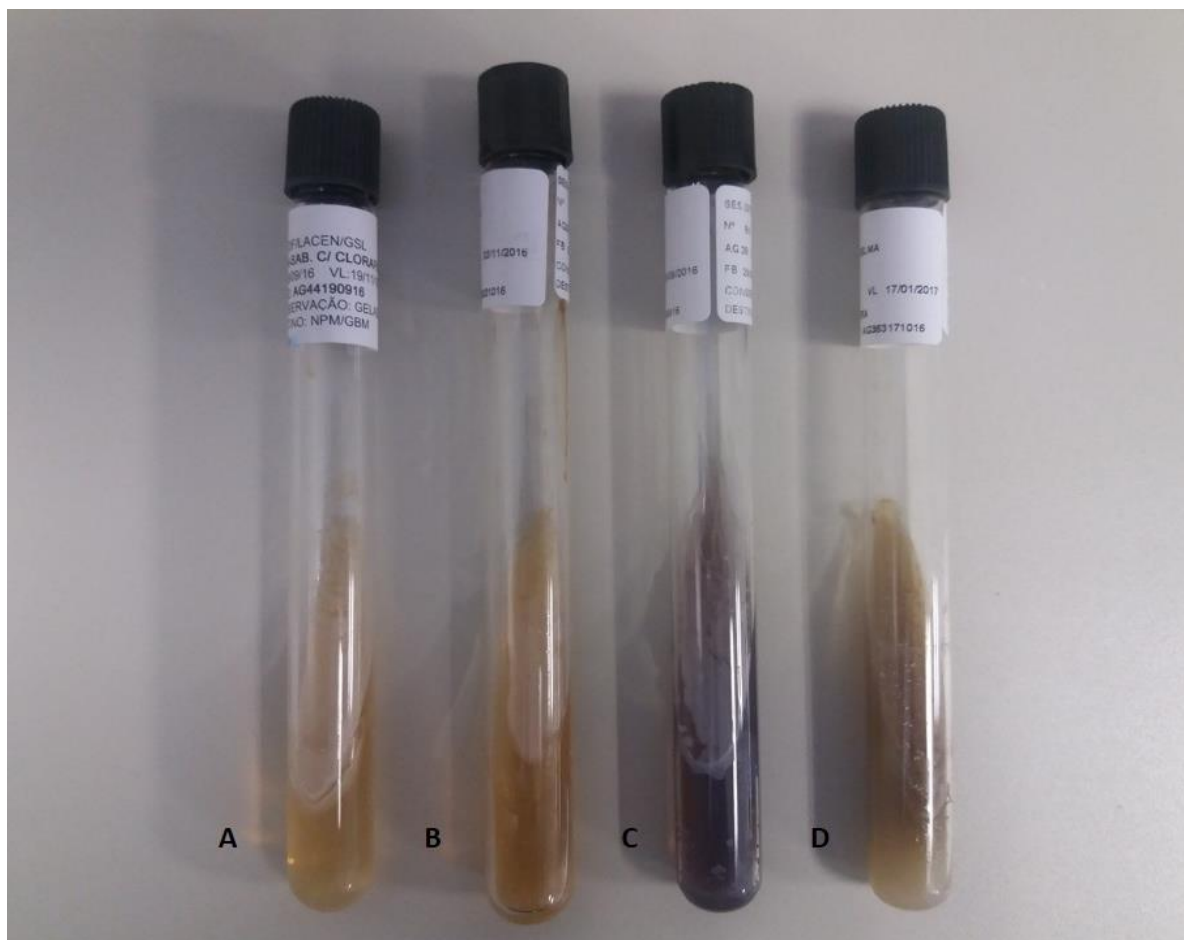


Figura 9 - Aspectos macroscópicos *Cryptococcus* spp. em meios de cultura
Crescimento em ágar Sabouraud (A), ágar Fava Neto (B), ágar Littman (C) e ágar Níger (D)

De forma complementar, foram realizadas identificações com testes bioquímicos automatizados, utilizando-se o equipamento VITEK® 2 Compact (BioMérieux®, França), os quais envolveram as reações de assimilação de carboidratos, ácidos orgânicos e nitrato e, reações de oxidase, aril-amidase e fosfatase. A realização destas provas serviu para confirmar a caracterização do *C. neoformans*, uma vez que, já era esperado a limitação na identificação do *C. gattii*, pois esta espécie não está presente no banco de dados do sistema. Todos os isolados clínicos (n=20) foram identificados como *C. neoformans*, evidenciando a limitação supracitada.

A diferenciação de *C. neoformans* e *C. gattii* deve ser realizada, pois entre estas espécies há contrastes de grande relevância clínica, como o perfil de hospedeiro e manejos clínicos, principalmente voltados a condições terapêuticas, no que tange a dosagem farmacológica, tempo de tratamento e perfil de sensibilidade aos antifúngicos. Diante ao reconhecimento do *C. gattii* como um patógeno emergente, o diagnóstico laboratorial

diferencial entre estas espécies tornou-se *sine qua non* para a resolução de casos de criptococose, exigindo abordagens moleculares adicionais.

Neste estudo, utilizando a técnica PCR-RFLP, com a amplificação do gene URA5, foi identificado 12 espécies de *C. neoformans var grubii* VNI (*C. neoformans*) e 8 espécies de *C. gattii* VGII (*C. deuterogattii*), que representam respectivamente 60 % e 40 % . Todos os isolados encontrados estão em consonância com o perfil de variantes predominantes no Brasil, entretanto as informações sobre a distribuição de espécies é bastante fragmentada, não havendo um consenso sobre a epidemiologia referente a criptococose (FAVALESSA, et al., 2014; HERKERT et al., 2016).

Segundo Meyer e cols. (2011), o tipo molecular VNI representa 63 % dos agentes etiológicos isolados em casos de criptococose no mundo inteiro, seguido de VGI (9 %), VGII (7 %), VNII e VNIII (6 % cada), VNIV (5 %), VGIII (3 %) e VGIV (1 %). Comparando os nossos dados, com os encontrados por Meyer e cols. (2011), observamos apenas dois genótipos identificados, VNI que correspondeu a 60 % do genótipo *C. neoformans var grubii* isolado em nossas amostras e que corrobora com os 63 % encontrados por estes pesquisadores, e o VGII que correspondeu a 40 % do do genótipo *C. gattii*, No Brasil, há um estudo realizado por Trilles e cols. (2008) com isolados clínicos, que apresenta similitude, sendo encontrado os seguintes tipos moleculares: VNI (64%) e VGII (21%), seguido de VNII (5%), VGIII (4%), VGI e VNIV (3% cada) e VNIII (<1%), não havendo identificação do tipo molecular VGIV.

Cabe ressaltar a que a identificação das espécies de *Cryptococcus* e suas variantes não apresenta apenas interesse taxonômico e epidemiológico, mas também auxilia na abordagem clínica, devido aos aspectos imunológicos e fatores de riscos distintos (KWON-CHUNG et al., 2014).

O *C. neoformans var grubii* VNI (*C. neoformans*) é fundamentalmente encontrado em amostras de pacientes imunocomprometidos infectados com HIV, já o *C. gattii* VGII (*C. deuterogattii*) está associado a pacientes não infectados com HIV e crianças, caracterizando a diferença entre o perfil de hospedeiro (DOS SANTOS et al., 2008).

Da mesma forma, diferenças nos perfis de sensibilidade aos antifúngicos são encontradas para estas duas variantes.

A análise por espectrometria de massa MALDI-TOF realizada no equipamento VITEK MS® (BioMérieux®, França) identificou todos os isolados como *C. neoformans* utilizando os bancos de dados MYLA® (BioMérieux®, França) e SARAMIS® (Shimadzu®,

Japão), revelando a limitação deste método em termos de diferenciação de espécies e suas variantes. Tal fato deve-se a aplicabilidade recente desta técnica para identificação de leveduras e pela elevada complexidade de inserção de novos espectros nos bancos de dados existentes.

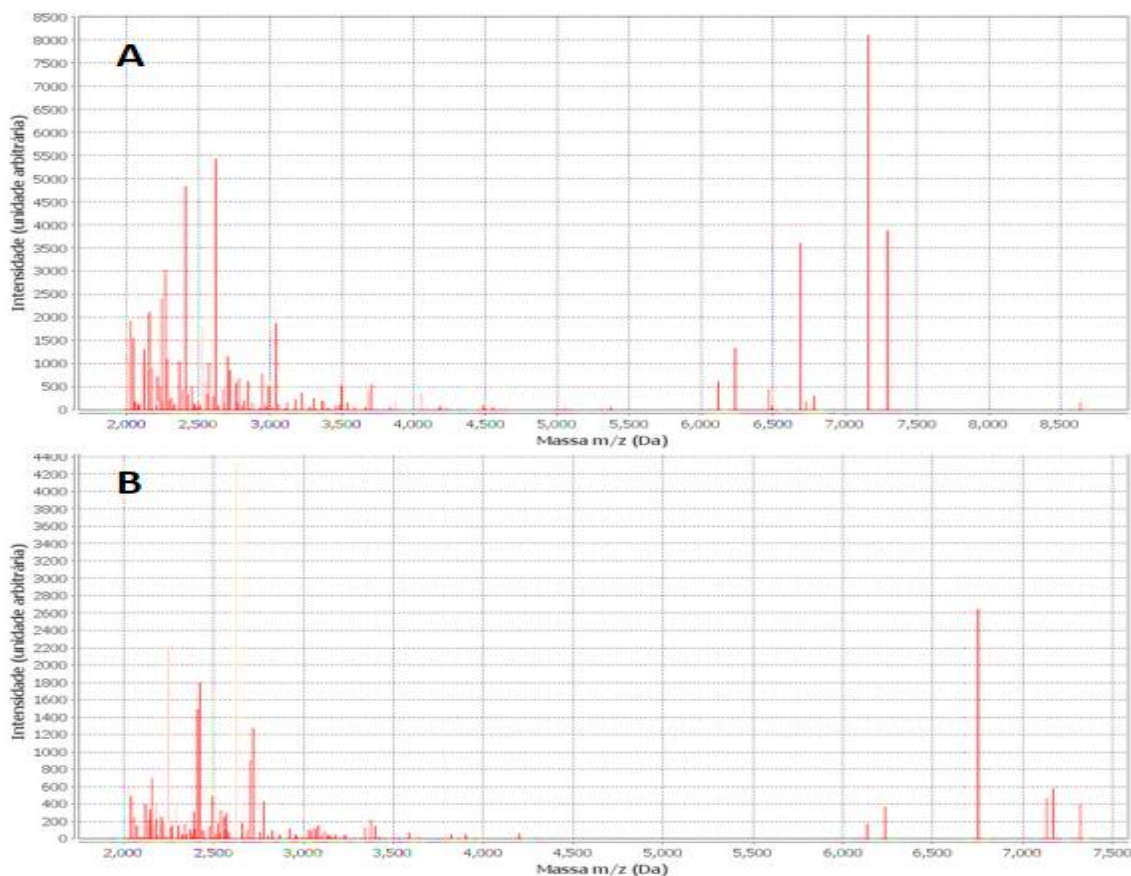


Figura 10 - Espectros de *Cryptococcus* na plataforma VITEK MS ®
Espectros de *C. neoformans* (A) e *C. gattii* (B)

Fazendo uma comparação das técnicas empregadas neste estudo (Tabela 7), conseguimos evidenciar limitações importantes entre as metodologias utilizadas. Entre as técnicas manuais o Ágar Níger diferencia *Cryptococcus* spp. de outras espécies fúngicas, como *Candida* spp. e *Trichophyton* spp., já o Ágar CGB demonstra eficiência na diferenciação entre as espécies de *Cryptococcus*, evidenciando suas potencialidades, quanto a a utilização como testes iniciais ou de triagem.

Observando o desempenho das técnicas automatizadas VITEK 2 e VITEK MS (MALDI-TOF), novamente verificamos limitações na identificação das espécies fúngicas, e temos que ressaltar essa pouca especificidade do método empregado no equipamento VITEK 2, que é muito utilizado na prática clínica para identificação de espécies, e apresentou 100 % de falha neste processo. Quanto ao MALDI-TOF, também observamos a mesma limitação

metodológica, entretanto sabemos que ao longo do tempo e com a inserção de novos espectros de identificação, é possível que esta especificidade melhore e consequentemente a técnica seja robusta o suficiente para auxiliar nas identificações de espécies. E finalmente, observando os resultados obtidos pela técnica molecular de PCR-RFLP, podemos afirmar que o método nos permitiu identificar a espécie, sua variante genotípica e genótipo, o que além de trazer aumento de sensibilidade e principalmente especificidade metodológica, traz confiabilidade laboratorial, e ainda corrobora com o manejo clínico farmacológico dos pacientes, aumentando assim as chances de cura da micose.

Tabela 7 - Técnicas utilizadas na identificação de *Cryptococcus* spp.

Tinta nanquim	Técnicas manuais			Técnicas automatizadas		Técnicas moleculares
	Ágar Uréia	Ágar Níger	Ágar CGB	VITEK 2	VITEK MS	PCR-RFLP
Leveduras encapsuladas (20)	<i>Cryptococcus</i> spp. (20)	<i>C. neoformans</i> (12)	<i>C. neoformans</i> (12)	<i>C. neoformans</i> (20)		VNI <i>C. neoformans</i> (12)
		<i>C. gattii</i> (8)	<i>C. gattii</i> (8)			VGII <i>C. deuterogattii</i> (8)

4.2 Perfil de susceptibilidade de *Cryptococcus* spp.

Para a determinação do perfil de suscetibilidade das amostras de *Cryptococcus* frente aos antifúngicos Anfotericina B (AB), Fluconazol (FLU) e 5-Fluorocitosina (FCT), utilizou-se cartões do tipo AST-YS07 (BioMérieux®, França) compatíveis com o equipamento VITEK® 2 Compact (BioMérieux®, França) e análises confrontativas com dados epidemiológicos correntes, no intuito de se parametrizar os resultados e obter uma interpretação quanto a sensibilidade ou resistência aos antifúngicos (Tabela 8).

Os resultados foram expressos em µg/mL, caracterizando a CIM (Tabela 9), entretanto quando se trata de *Cryptococcus* spp., não há valores de referência estabelecidos para os antifúngicos em questão, por isso a necessidade de se utilizar os *Epidemiologic Cut-off value* (ECV), para possibilitar avaliações (ESPINEL-INGROFF, et al., 2012a e 2012b).

Tabela 8 - ECV para drogas antifúngicas usadas no tratamento da criptococose

Espécie	Genótipo	Drogas Antifúngicas	Sensível ($\mu\text{g/mL}$)	Resistente ($\mu\text{g/mL}$)
<i>C. neoformans</i>	VNI	AB	$\leq 0,5$	$> 0,5$
		FLU	≤ 8	> 8
		FCT	≤ 8	> 8
<i>C. gattii</i>	VGII	AB	≤ 1	> 1
		FLU	≤ 32	> 32
		FCT	≤ 16	> 16

Anfotericina-B (AB), Fluconazol (FLU) e 5-Fluorocitosina (FCT)

Adaptado de ESPINEL-INGROFF, et al., 2012a e 2012b

Dentre todos os isolados clínicos ($n = 20$) foram identificadas 3 situações de resistência a AB, sendo 2 em *C. neoformans* VNI e 1 em *C. gattii* VGII, fato também elucidado em estudos anteriores, como em Da Silva e Cols, 2008 e Andrade-Silva e cols, 2013, que demonstraram resistência a AB, mas sem a descrição de seu mecanismo, entretanto pode estar associada a alteração na composição do ergosterol da membrana fúngica, em virtude de mediação por aumento da atividade da catalase e/ou defeitos na biossíntese de ergosterol (JOSEPH-HORNE et al., 1996; RODRÍGUEZ-TUDELA & MARTINEZ-SUAREZ, 1997; PEMÁN, CANTÓN & ESPINEL-INGROFF, 2009).

Tabela 9 - Resultados dos testes de susceptibilidade do Vitek 2 Compact

Espécie	Genótipo	Drogas Antifúngicas	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	Ocorrência	Interpretação (ECV)
<i>C. neoformans</i>	VNI	AB	$\leq 0,25$	9/12	Sensível
			0,5	1/12	Sensível
			1	2/12	Resistente
		FLU	2	11/12	Sensível
			4	1/12	Sensível
			≤ 1	11/12	Sensível
			FCT	2	1/12
<i>C. gattii</i>	VGII	AB	$\leq 0,25$	4/8	Sensível
			0,5	1/8	Sensível
		1	2/8	Sensível	
		4	1/8	Resistente	
		FLU	2	4/8	Sensível
FCT	4	4/8	Sensível		
	1	8/8	Sensível		

4.3 Atividade antifúngica do extrato aquoso de *Eugenia dysenterica*

A atividade antifúngica do extrato aquoso de *E. dysenterica* foi evidenciada contra *C. neoformans* e *C. gattii* a partir de microdiluições em placa, que permitiram a identificação de uma CIM (Tabela 10), assim como no estudo de Costa e cols. (2000) que demonstrou atividade contra *Cryptococcus* spp.

Alguns estudos indicam ação de outras espécies da família Myrtaceae contra *Cryptococcus* spp. Segundo Ferreira e cols. (2014), extratos obtidos da casca e folhas de

Eugenia calycina possuem ação contra *Cryptococcus* sp., *C. neoformans* e *C. gattii*. Victoria e cols (2012), citam que extrato de folhas de *E. uniflora* possui atividade contra *C. laurentii*, assim como Lago e cols (2011), para *C. neoformans* e *C. gattii*.

Tendo em vista os resultados obtidos a partir dos estudos com extratos brutos de espécies de *Eugenia* percebe-se o grande potencial antifúngico desta planta, candidatando-a como para o desenvolvimento de novos fármacos, visto que os tratamentos convencionais apresentam nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e mielotoxicidade (GULLO et al., 2013).

Além disso, o extrato vegetal de *E. dysenterica* deve ser considerado um fitocomplexo e não, um conjunto de substâncias isoladas, o que enaltece ainda mais sua atividade biológica. Os fitocomplexos são substâncias originadas no metabolismo primário ou secundário, ou mesmo ambos, dos extratos das plantas, e são responsáveis em sua totalidades pelos efeitos biológicos de uma planta medicinal ou de seus derivados (BRASIL, 2014). Assim sendo, poderíamos atribuir as atividades biológicas dos extratos à presença destes compostos ativos, que podem agir sinergicamente e também conferir efeitos diretos e indiretos. O efeito direto refere-se a sua ação farmacológica, enquanto o indireto às interações simultâneas com outras plantas ou fármacos (MARTINS et al., 2015).

Analisando os resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) obtidas com o extrato aquoso de *E. dysenterica* (Tabela 10), podemos afirmar que os valores obtidos apresentam potencialidade fungicida relevante, principalmente se considerarmos que houve resistência a um antifúngico usual no tratamento da criptococose, a Anfotericina B.

Contudo, são necessários mais estudos para avaliar o potencial antifúngico de *E. dysenterica* e possíveis ações sinérgicas com demais antifúngicos comerciais, assim como estabelecer claramente mecanismos de ação e validar sua eficácia em estudos *in vivo*.

Tabela 10 - CIM de FLU (controle) e *E. dysenterica*

Identificação molecular (PCR-RFLP)	Espécie identificada	CIM (FLU – controle) µg/mL	CIM (<i>E. dysenterica</i>) µg/MI	Ocorrência
VGII	<i>C.gattii</i>	1,95	> 100000	2/8
		3,9	24	2/8
		3,9	>1000	1/8
		3,9	390	1/8
		1,95	24	1/8
		3,9	48	1/8
		1,95	> 100000	6/12
		1,95	195	2/12
		1,95	24	1/12
VNI	<i>C.neoformans</i>	1,95	1562	1/12
		1,95	781	1/12
		3,9	> 100000	1/12

5 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste estudo, nos permitem concluir que:

O LCR foi o espécime clínico predominante, que correspondeu a 75% do total de amostras analisadas, e apenas neste material biológico foi possível visualizar estruturas leveduriformes encapsuladas correspondente ao *Cryptococcus* spp.

A utilização de ágar CGB permitiu a diferenciação dos isolados em *C. neoformans* e *C. gattii*, havendo predomínio do primeiro (60%) frente ao segundo (40%), ressaltando a importância dessa metodologia para a triagem na identificação das espécies.

Os testes bioquímicos automatizados realizados na plataforma VITEK® 2 Compact (BioMérieux®, França) identificou todos os isolados como *C. neoformans*, revelando sua limitação quanto a diferenciação entre espécies de *Cryptococcus*.

A análise por espectrofotometria de massa revelou-se insuficiente para a identificação de espécies e variantes de *Cryptococcus* spp. uma vez que, ainda possui um banco de dados limitado, não havendo espectros padrões de *C. gattii* para se realizar as correlações.

A técnica molecular PCR-RFLP possibilitou a diferenciação de espécies e suas variantes, identificando 12 espécies de *C. neoformans* var *grubii* VNI (*C. neoformans*) e 8 espécies de *C. gattii* VGII (*C. deuterogattii*), que representam respectivamente 60 % e 40 %. Estes resultados concordaram com os resultados em ágar CGB e com os padrões epidemiológicos encontrados em estudos nacionais e internacionais.

São necessárias combinações entre métodos clássicos manuais empregados para a triagem na identificação das espécies de *Cryptococcus*, e o método molecular PCR-RFLP, que juntos complementam para a identificação das espécies de *Cryptococcus* spp.

Para a determinação do perfil de suscetibilidade das amostras de *Cryptococcus* frente aos antifúngicos AB, FLU e FCT utilizou-se cartões do tipo AST-YS07 (BioMérieux®, França) no equipamento VITEK® 2 Compact (BioMérieux®, França) e constatou-se 3 situações de

resistência a AB, sendo 2 em *C. neoformans* VNI e 1 em *C. gattii* VGII. Os valores de CIM obtidos foram comparados com valores epidemiológicos convencionados. Como não há valores de referência estabelecidos para os antifúngicos em questão, utilizamos *Epidemiologic Cut-off value* (ECV).

O extrato aquoso de folhas de *E. dysenterica* apresentou atividade antifúngica contra *C. neoformans* e *C. gattii*, mesmo para as cepas que apresentaram resistência a antifúngicos empregados na terapêutica como a Anfotericina B. Considerando o fato de o extrato ser um fitocomplexo, podemos afirmar que há perspectivas em considerá-lo com potencial para o desenvolvimento de novos fármacos, e também para o isolamento de novas substâncias com atividade fungicida, o que traria novos tratamentos com menos toxicidade e melhores chances de cura para os casos de resistência a antifúngicos convencionais.

De maneira geral, os resultados do estudo apontam estratégias metodológicas que devem ser empregadas na prática laboratorial para a correta identificação da espécie e variante do fungo *Cryptococcus*, bem como a implantação de antifungigrama com as drogas mais usuais, mesmo sem valores de referências de CIM totalmente padronizados, o que traria a estes pacientes uma perspectiva de diagnóstico laboratorial mais precisa e conseqüentemente diagnóstico clínico e tratamento farmacológico mais eficientes. Além disso, a *E. dysenterica* apresentou potencialidades fungicidas evidentes para estas espécies fúngicas, cada vez mais prevalentes em nosso meio e com pouco arsenal terapêutico convencional disponível, o que faz esta micose ter relevante taxa de mortalidade no Brasil e no mundo, e ser considerada um problema de saúde pública emergente.

6 REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, P. C.; RODRIGUES, M. L. Research trends on pathogenic *Cryptococcus* species in the last 20 years: a global analysis with focus on Brazil. **Future Microbiol**, v. 7, p. 319-329, 2012.
- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. Cerrado: espécies vegetais úteis. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária editor. Planaltina, DF: EMBRAPA**, p. 464, 1998.
- AMARO, M. C. O. Caracterização de isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* quanto à susceptibilidade a fluconazol. **Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**, 2006.
- ANDRADE-SILVA, L.; et al. Susceptibility profile of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Med Mycol.**, v. 51, p. 635-640, 2013.
- ASSOB, J. C. N.; KAMGA, H. L. F.; NSAGHA, D.S.; NJUNDA, A.L.; NDE, P.F.; ASONGALEM, E. A.; NJOUENDOU, A. J.; SANDJON, B.; PENLAP, V. B;. Antimicrobial and toxicological activities of five medicinal plant species from Cameroon traditional medicine. **BMC Compl Altern Med**, v.11, p. 1-27, 2011.
- ASSOGBA, K.; et al. Neuromeningeal cryptococcosis in sub-Saharan Africa: killer disease with sparse data. **J. Neurosci. Rural Pract**, v. 6, p. 221-224, 2015.
- ARAÚJO JÚNIOR, E. C.; TÁRPARO, C.V.; UCHIDA, C.Y.; MARINHO, M. Cryptococcus: isolamento ambiental e caracterização bioquímica. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v .67, 2015.
- ARVANITIS, M. et al. Molecular and nonmolecular diagnostic methods for invasive fungal infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, p. 490-526, 2014.
- BAGINSKI, M.; CZUB, J. Amphotericin B and Its New Derivatives - Mode of Action. **Current Drug Metabolism**, v. 10, p. 459-469, 2009.
- BAHN, Y. S.; JUNG, K. W. Stress signaling pathways for the pathogenicity of *Cryptococcus*. **Eukaryot Cell**, v. 12, p. 1564-1577, 2013.
- BARBOSA JÚNIOR, A. M.; SANTOS, B. F. O.; CARVALHO, E. O.; MELO, D. L. F. M.; TRINDADE, R. C.; STOIANOFF, M. A. R. Biological activity of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from clinical and environmental isolates. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 49, 2013.
- BATTISTI, C.; GARLET, T. M. B.; ESSI, L.; HORBACH, R. K.; ANDRADE, A.; BADKE, M. R. Plantas medicinais utilizadas no município de Palmeira das Missões, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, p. 338-348, 2013.

BIVANCO, F. C.; MACHADO, C. D. S.; MARTINS, E. L. Criptococose cutânea. **Arq Med ABC**, v. 31, p. 102-109, 2006.

BENADUCCI, T.; SARDI, J. C. O.; LOURENCETTI, N. M. S.; SCORZONI, L.; GULLO F. P.; ROSSI, S. A.; DERISSI, J. B.; PRATA, M. C. A.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J .S. Virulence of *Cryptococcus spp.*. Biofilms In Vitro and In Vivo using *Galleria mellonella* as an Alternative Model. **Front. Microbiol**, v. 9, 2016.

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

BICANIC, T.; MEINTJES, G.; WOOD, R.; HAYES, M.; REBE, K.; et al. Fungal burden, early fungicidal activity, and outcome in cryptococcal meningitis in antiretroviral-naive or antiretroviral-experienced patients treated with amphotericin B or fluconazole. **Clin Infect Dis**, v. 45, p.76-80, 2007.

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

BOVERS, M.; HAGEN, F.; BOEKHOUT, T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* species complex. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, p. 4-12, 2008.

BRATTON, E. W.; et al. Comparison and temporal trends of three groups with cryptococcosis: HIV-infected, solid organ transplant, and HIV-negative/non-transplant. **PLoS ONE**, v.7, 2012.

BRASIL. Resolução RDC nº 26 de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o “**Registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos**”. Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 15 de maio de 2016.

BRITO, M. A.; PEREIRA, E. B. C.; PEREIRA, A. V.; RIBEIRO, J. F. Cagaita: biologia e manejo. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária editor. Planaltina, DF: EMBRAPA**, 2003.

BUCHANAN, K. L.; MURPHY, J. W. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? **Emerg Infect Dis**, v. 4, p. 71-83, 1998.

BYRNES, E. J.; BILDFELL, R. J.; FRANK, S. A.; MITCHELL, T. G.; MARR, K.A.; et al. Molecular evidence that the range of the Vancouver Island outbreak of *Cryptococcus gattii* infection has expanded into the Pacific Northwest in the United States. **J Infect Dis**, v.199: p. 1081–1086, 2009a.

BYRNES, E. J.; LI, W.; LEWIT, Y.; PERFECT, J. R.; CARTER, D. A.; COX, G. M; et al. First Reported Case of *Cryptococcus gattii* in the Southeastern USA: Implications for Travel-Associated Acquisition of an Emerging Pathogen. **PLoS ONE**, v. 4, 2009b.

CAMPOS, F. L.; BARONI, F. A. Isolados de *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii* produtores de protease e fosfolipase. **Revista de Patologia Tropical**, v.39, p. 83-89, 2010.

CAMILO, Y. M. V.; SOUZA, E. R. B.; VERA, R.; NAVES, R. V. Caracterização de frutos e seleção de progênies de cagaiteiras (*Eugenia dysenterica* DC.). **Científica**, v. 42, p. 1-10, 2014.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; GIUSIANO, G.; EZKURRA, P. A.; QUINDÓS, G. Antifungal agentes: Mode of action in yeast cells. **Rev. Esp. Quimioterap.**, v. 19, p. 130-139, 2006.

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

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

CECÍLIO, A. B. FARIA, D. B.; OLIVEIRA, P. C.; CALDAS, S.; OLIVEIRA, D. A.; SOBRAL, M. E. G.; et al. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 975-981, 2012.

CHAPELAND-LECLERC, F.; BOUCHOUX, J.; GOUMAR, A.; CHASTIN, C.; VILLARD, J.; NOÉ, T. Inactivation of the FCY2 Gene Encoding Purine-Cytosine Permease Promotes Cross-Resistance to Flucytosine and Fluconazole in *Candida lusitanae*. **Journal List - Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, 2005.

CHATURVEDI, V.; WONG, B.; NEWMAN, S. L. Oxidative killing of *Cryptococcus neoformans* by human neutrophils. Evidence that fungal mannitol protects by scavenging reactive oxygen intermediates. **The Journal of Immunology**, v. 156, p. 3836-3840, 1996.

CLSI. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Guideline. **Waive, Pensilvânia - USA**, 2004.

COENJAERTS, F. E. J. The sixth International Conference on Cryptococcus and Cryptococcosis. **FEMS. Yeats Res**, v. 6, p. 312-317, 2006.

COGLIATI, M. Global molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: an atlas of the molecula. **Scientifica (Cairo)**, 2013.

COGLIATI, M.; ZANI, A.; RICKERTS, V.; MCCORMICK, I.; DESNOS-OLLIVIER, M.; VELEGRAKI, A.; ESCANDON, P.; ICHIKAWA, T.; IKEDA, T.; et al. Multilocus sequence typing analysis reveals that *Cryptococcus neoformans var. neoformans* is a recombinant population. **Fungal Genetics and Biology**, v. 87, p. 22-29, 2016.

COLOMBO, A. C.; RODRIGUES, M. L. Fungal colonization of the brain: anatomopathological aspects of neurological cryptococcosis. **An. Acad. Bras. Ciênc**, v.87, 2015.

COLOMBO, G; TÁPARO, C.V.; ARAÚJO JÚNIOR, E.C.; MAKATU, M. Y.; SANTOS, F.S.; MARINHO, M. Biochemical and molecular characterization of *Cryptococcus* spp. isolates from environmental feces of pigeons (*Columba livia domestica*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, 2015.

COSTA, A. K. F. Análise fenotípica e molecular de cepas de *Cryptococcus* spp obtidas de fontes ambientais e clínicas. **Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará**, 2009.

COSTA, C. R.; LULI, F. B. D.; CARNEIRO, J. R.; CARDOSO, A. M. Infecções fúngicas em pacientes HIV positivos: Revisão da literatura sobre criptococose e histoplasmoze. **Estudos**, v. 41, p. 843-854, 2014.

COSTA, T. R.; et al. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 111-117, 2000.

CORREA, M. P. S. C.; OLIVEIRA, E. C.; DUARTE, R. R. B. S.; PARDAL, P. P. O.; OLIVEIRA, F. M.; SEVERO, L. C. Criptococose em crianças no estado do Pará, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, p. 505-508, 1999.

CORREIA, A. F.; et al. Activity of crude extracts from Brazilian cerrado plants against clinically relevant *Candida* species. **BMC Complement Altern Med**, v. 16, 2016

CORREIA, A. F.; SEGOVIA, J. F. O.; GONÇALVES, M. C. A.; OLIVEIRA, V. L.; SILVEIRA, D; CARVALHO, J. C. T.; KANZAKI, L. I. B. Amazonian plant crude extract screening for activity against multidrug-resistant bacteria. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 12, p. 369-380, 2008.

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

DARZÉ C.; LUCENA, R.; GOMES, I.; MELO, A. Clinical and laboratory characteristics of 104 cryptococcus meningoencephalitis cases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 21-26, 2000.

DA SILVA, P. R.; et al. Suscetibilidade a antifúngicos de variedades de *Cryptococcus neoformans* isoladas de pacientes em hospital universitário. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.41, 2008.

DATTA, K.; BARTLETT, K. H.; BAER, R.; BYRNES, E.; GALANIS, E.; et al. Spread of *Cryptococcus gattii* into Pacific Northwest region of the United States. **Emerg Infect Dis**, v. 15, p. 1185–1191, 2009.

DE CAROLIS, E.; VELLA, A.; VACCARO, L.; TORELLI, R.; SPANU, T.; FIORI, B.; POSTERARO, B.; SANGUINETTI, M. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **J Infect Dev Ctries**, v. 8, p. 1081-1088, 2014.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENE, J.; FIGUERAS, M. J. Atlas of Clinical Fungi. **Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands**. 2000.

DOERING, T. L. How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. **Annu Rev Microbiol**, v. 63, p. 223–247, 2009.

DOLANDE FRANCO, M. Factores de virulencia e inmunidad en criptococosis. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 21, 2011.

DORA, C. L.; SOUZA, L. C. Novas formas comerciais de anfotericina B. **Revista de Ciências Médicas**, v. 42, p. 187-197, 2005.

DORIGONI, P. A.; GHEDINI, P. C.; FRÓES, L. F.; BAPTISTA, K. C.; ETHUR, A. B. M.; BALDISSEROTTO, B.; BÜRGER, M. E.; ALMEIDA, C. E.; LOPES, A.M.; ZÁCHIA, R. A. Levantamento de dados sobre plantas medicinais de uso popular no município de São João do Polêsine, RS, Brasil. I – Relação entre enfermidades e espécies utilizadas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 4, p. 69-79, 2001.

DOS SANTOS, W. R. A. et al. Primary endemic *Cryptococcosis gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.103, 2008.

DROMER, F.; BERNEDE-BAUDUIN, C.; GUILLEMOT, D.; LORTHOLARY, O. Major role for amphotericin B-flucytosine combination in severe cryptococcosis. **PLoS ONE**, v.3, 2008.

DUARTE, A. et al. Genetic and Environmental Influence on Essential Oil Composition of *Eugenia dysenterica*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 1459-1467, 2010.

DUBOC, E.; GUERRINI, I. A. Desenvolvimento inicial e nutrição da cagaita em áreas de cerrado degradado. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária editor. Planaltina, DF: EMBRAPA**, 2007;

EISENMAN, H.C.; CASADEVALL, A. Synthesis and assembly of fungal melanin. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 93, p. 931-940, 2012.

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

ENACHE-ANGOULVANT, A.; CHANDENIER, J.; SYMOENS, F.; LACUBE, P.; BOLOGNINI, J.; DOUCHET, C.; POIROT, J. L.; HENNEQUIN, C. Molecular identification of *Cryptococcus neoformans* serotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 1261-1265, 2007.

ESPINEL-INGROFF, A.; CHOWDHARY, A.; CUENCA-ESTRELLA, M.; FOTHERGILL, A.; FULLER, J.; et al. *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and flucytosine. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, p. 3107-3113, 2012a.

ESPINEL-INGROFF, A.; ALLER, A. I.; CANTON, E.; CASTANON-OLIVARES, L. R.; CHOWDHARY, A.; et al. *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological

cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, p. 5898-5906, 2012b.

FAGANELLO, J.; ARRUDA, W.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. An alternative method to prepare samples of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* for scanning electron microscopy analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 64, p. 416-419, 2006.

FAVALESSA, O. C.; et al. Molecular typing and in vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus* spp from patients in Midwest Brazil. **J Infect Dev Ctries.**, v. 13, p. 1037-1043, 2014.

FARIA, R. O.; NASCENTE, P. S.; MEINER, A. R. M.; CLEFF, M. B.; ANTUNES, T. A.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B. Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in pigeon excrement in the city of Pelotas, State of Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 198-200, 2010.

FARIA JÚNIOR, J. E. Q. O gênero *Eugenia* L.(Myrtaceae) nos estados de goiás e tocantins, Brasil [Dissertation]. **Brasília: Universidade de Brasília**, 2010.

FERNANDES, O. F. L.; COSTA, T. R.; COSTA, M. R.; SOARES, A. J. S.; PEREIRA, A. J. S. C.; SILVA, M. R. R. *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com AIDS. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 75-78, 2000.

FERREIRA, F. P. S., et al. *Eugenia calycina* Cambess extracts and their fractions: Their antimicrobial activity and the identification of major polar compounds using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 99, p. 89 - 96, 2014.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 167-193, 2006.

FISHER, F.; COOK, N. B. Micologia: fundamentos e diagnóstico. **Revinter**, p. 337, 2001.

FLEVARI, A. et al. Treatment of invasive candidiasis in the elderly: a review. **Journal of Clinical Interventions in Aging**, v. 8, p. 1199-1208, 2013.

FRANZOT, S. P.; HAMDAN, J. S.; CURRIE, B. P.; CASADEVALL, A. Molecularepidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Brazil and the United States: evidence for both local genetic differences and a global clonal population structure. **J. Clin. Microbiol**, v. 35, p. 2243-2251, 1997.

FRIES, B. C.; TABORDA, C. P.; SERFASS, E.; CASADEVALL, A. Phenotypic switching of *Cryptococcus neoformans* occurs in vivo and influence the outcome of infection. **J Clin Invest**, v. 108, p. 1639-1648.

FRIESE, G.; DISCHER, T.; FUSSLE, R.; et al.. Development of azole resistance during fluconazole maintenance therapy for AIDS associated cryptococcal disease. **AIDS**, v.15, p. 2344-2345.

GALANIS, E.; HOANG, L.; KIBSEY, P.; MORSHED, M.; PHILLIPS, P. Clinical presentation, diagnosis and management of *Cryptococcus gattii* cases: Lessons learned from British Columbia. **Can J Infect Dis Med Microbiol**, v. 20, p. 23-28, 2009.

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

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 501-517, 1999.

GOMES, F. S.; SARMENTO, D. N.; ESPÍRITO SANTO, E. P. T.; SILVA, H. M. Quimiotipagem e caracterização fenotípica de *Cryptococcus* isolados em Belém, Estado do Pará, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, v.1, 2010.

GOVENDER, N. P.; MEINTJES, G.; BICANIC, T.; DAWOOD, H.; HARRISON, T. S.; JARVIS, N.; KARSTAEDT, S.; MAARTENS, G.; MCCARTHY, K. M.; et al. Guideline for the prevention, diagnosis and management of cryptococcal meningitis among HIV-infected persons: 2013 update. **Sajhivmed**, v. 14, p. 76-86, 2013.

GULLO, E. P.; et al. Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 2013.

GUTCH, R. S.; NAWANGE, S. R.; SINGH, S. M.; YADU, R.; TIWARI, A.; GUMASTA, R.; KAVISHWAR, A. Antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates in Jabalpur, a city of Madhya Pradesh in Central India. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, 2015.

HAGEN, F.; KHAYHAN, K.; THEELEN, B.; KOLECKA, A.; POLACHEK, I.; SIONOV, E.; FALK, R.; PARNMEN, S.; THORSTEN LUMBSCH, H.; BOEKHOUT, T.. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex, **Fungal Genetics and Biology**, 2015.

HARRINGTON, B. J.; HAGEAGE, G. J. Calcofluor White: A Review of its Uses and Applications in Clinical Mycology and Parasitology. **Your Lab Focus: Laboratory medicine**, v. 34, p. 361-367, 2003.

HATA, J. D. et al. Multicenter Evaluation of the New VITEK 2 Advanced Colorimetric Yeast Identification Card **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 4 , p. 1087-1092, 2007.

HAYNES, B. C.; SKOWYRA, M. L.; et al. Toward an Integrated Model of Capsule Regulation in *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Pathog**, v. 7, p.1, 2011.

HERKERT, P. F. et al. Molecular characterisation and antifungal susceptibility of clinical *Cryptococcus deuterogattii* (AFLP6/VGII) isolates from Southern Brazil. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.35, p. 1803-1810, 2016.

HENAO-MARTÍNEZ, A. F.; BECKHAM, J. D. Cryptococcosis in solid organ transplant recipients. **Curr. Opin. Infect. Dis**, v. 28, p. 300-307, 2015.

HUSTON, S. M.; MODY, C. H. Cryptococcosis: an emerging respiratory mycosis. **Clinics in Chest Medicine**, v. 30, p. 253-264, 2009.

JACKSON, N. A.; HERRING, D. B. Primary capsule-deficient cutaneous cryptococcosis in a sporotrichoid pattern in an immunocompetent host. **Cutis**, v. 9, p. 26-29, 2015.

JACOBSON, E. S. Pathogenic Roles of Fungal Melanins. **Clin Microbiol Rev**, v.13, p. 708-717, 2000.

JOSEPH-HORNE, T. et al. Amphotericin B resistant isolates of *Cryptococcus neoformans* without alteration in sterol biosynthesis. **J Med Vet Mycol**, v. 34, p. 223-225, 1996

KIDD, S.E.; CHOW, Y.; MAK, S.; BACH, P. J.; CHEN, H.; et al. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, p. 1433–1443, 2007.

KIM, S. H. et al. Misidentification of *Candida guilliermondii* as *Candida famata* among strains isolated from blood cultures by the VITEK 2 system. **BioMed Research International**, p. 1-6, 2014.

KLEIN, K. R.; HALL, L.; DEML, S. M.; RYSAVY, J. M.; WOHLFIEL, S. L. Identification of *Cryptococcus gattii* by use of L-canavanine glycine bromothymol blue medium and DNA sequencing. **J Clin Microbiol**, v. 47, p. 3669-3672, 2009.

KWONG-CHUNG, J.; BENNETT, J. **Medical Mycology**, Philadelphia, PA, 1992.

KWON-CHUNG, J.; FELL, J. W. *Filobasidiella*. Kwong-Chung. In: Kreger van Rij (ed.). *The yeast: a taxonomic study*. Elsevier Science Publishers, p.467-495, 1987.

KWON-CHUNG, J.; et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v.4, 2014.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO. *Tratado de Micologia Médica*. São Paulo. **Sarvier**, p. 416-435, 2002.

LAGO, J. H. G., et al. Chemical and Biological Evaluation of Essential Oils from Two Species of Myrtaceae - *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel. **Molecules**, v. 16, p. 9827-9837, 2011.

LARONE, D. H. *Medically Important Fungi: a Guide to Identification*. **Washington: ASM PRESS**, p. 136, 1995.

LATOUCHE, G.N.; HUYNH, M.; SORRELL, T.C.; MEYER, W. PCR-Restriction FragmentLength Polymorphism Analysis of the Phospholipase B (PLB1) Gene for Subtyping of *Cryptococcus neoformans* Isolates. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 2080-2086, 2003.

LAZÉRA, M. S.; IGREJA, R. P.; WANKE, B. *Criptococose*. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA M. F. G. *Micologia Médica: Á luz de autores contemporâneos*. **Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.**, p. 89-101, 2004.

- LEITE JR, D. P.; AMADIO, J. V. R. S.; MARTINS, E. R.; SIMÕES, S. A. A.; et al.. Cryptococcus spp isolated from dust microhabitat in Brazilian libraries. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, 2012.
- LEV, S.; LI, C.; DESMARINI, D.; SAIARDI, A.; FEWINGS, N. L.; SCHIBECI, S. D.; SHARMA, R.; SORRELL, T.C.; DJORDJEVIC, J.T. Fungal inositol pyrophosphate IP7 is crucial for metabolic adaptation to the host environment and pathogenicity. **mBio**, v. 6, 2015.
- LEV, S.; LI, C.; DESMARINI, D.; SAIARDI, A.; FEWINGS, N. L.; SCHIBECI, S. D.; SHARMA, R.; SORRELL, T.C.; DJORDJEVIC, J.T. Identification of a major IP5 kinase in *Cryptococcus neoformans* confirms that PP-IP5/IP7, not IP6, is essential for virulence. **Scientific Reports**, v.6, 2016.
- LEVITZ, S. M.; BOEKOUT, T. *Cryptococcus*: the once sleeping-giant is fully awake. **FEMS Yeast Research**, v. 6, p. 461-462, 2006.
- LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: Morphogenesis, infection, and evolution. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, p. 401-416, 2009.
- LIU, Y.; QUNPENG, H.; SHUTIAN, X.; HONGLANG, X. Fatal primary cutaneous cryptococcosis: case report and review of published literature. **Ir J Med Sci**, 2015.
- LOCKHART, S. R.; IQBAL, N.; et al. *Cryptococcus gattii* in the United States: Genotypic Diversity of Human and Veterinary Isolates. **PLoS ONE**, v. 8, p. 1, 2013.
- LOPERENA-ALVAREZ, Y.; REN, P.; LI, X.; BOPP, D.J.; RUIZ, A; et al. Genotypic characterization of environmental isolates of *Cryptococcus gattii* from Puerto Rico. **Mycopathologia**, v.170: p. 279–285, 2010.
- LORENZI, H. *Arvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Editora UFV, p. 368, 2002..
- LOURENÇO, A. Site: <http://www.microbiologia.vet.br>. **Microbiologia**, acessado dia 18 de dezembro as 22:13, 2015.
- MANDAL, P.; ROY, T. S.; DAS, T. K.; BANERJEE, U.; XESS, I.; NOSANCHUK, J. D. Differences in the cell wall architecture of melanin lacking and melanin producing *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from India: an electron microscopic study. **Braz. J. Microbiol**, v. 38, 2007.
- MARRA, R. E.; HUANG, J. C.; FUNG, E.; NIELSEN, K.; HEITMAN, J.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T. G. A genetic linkage map of *Cryptococcus neoformans* variety *neoformans* serotype D (*Filobasidiella neoformans*). **Genetics**. v. 167, p. 619-31, 2004.
- MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Biofilm formation by *Cryptococcus neoformans*. **Microbiol. Spectr**, v. 3, p. 1-11, 2015.

MARTINOTTO, C.; PAIVA, R.; SOARES, F. P.; SANTOS, B. R.; NOGUEIRA, R. C. Cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.). **Lavras-MG: Universidade Federal de Lavras**, p. 1-21, 2008.

MARTINS, N. B. L.; HENRIQUES, M.; SILVA, S. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida*. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 648-670, 2015.

MARTINY, D.; BUSSON, L.; WYBO, I.; EL HAJ, R. A.; DEDISTE, A.; VANDENBERG, O. Comparison of the Microflex LT and Vitek® MS systems for the routine identification of bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry. **J. Clin. Microbiol.**, v. 50, p. 1313-1325, 2012.

MASSONET, C.; ELDERE, J. V.; VANEECHOUTTE, M.; BAERE, T.; VERHAEGEN, J.; LAGROU, K. Comparison of VITEK 2 with ITS2-Fragment Length Polymorphism Analysis for Identification of Yeast Species. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 2209-2211, 2004.

MAZUTI SILVA, S. M.; GASCA SILVA, C. A.; FONSECA-BAZZO, Y. M.; Pérola Oliveira MAGALHÃES, P. O.; SILVEIRA, D. *Eugenia dysenterica* (Mart.) Ex DC. (cagaiteira): planta brasileira com potencial terapêutico. **Infarma: Ciências Farmacêuticas**, v. 27, p. 49-95, 2015.

MCCARTY, T. P.; PAPPAS, P. G. Invasive Candidiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, 2015.

MCCLELLAND, E. E.; HOBBS, L. M.; RIVERA, J.; CASADEVALL, A.; POTTS, W. K.; SMITH, J. M.; et al. The role of host gender in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* infections. **PLoS ONE**, v. 8, 2013.

MCTAGGART, L. R.; LEI, E.; RICHARDSON, S. E.; HOANG, L.; FOTHERGILL, A.; ZHANG, S. X. Rapid Identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **J. Clin. Microbiol.**, v. 49, p. 3050-3055, 2011.

MELHEM, M. S. C.; BERTOLETTI, A.; LUCCA, H. R. L.; SILVA, R. B. O.; MENEGHIN, F.A.; SZESZS, M. W. Use of the VITEK 2 system to identify and test the antifungal susceptibility of clinically relevant yeast species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p.1257-1266, 2013.

MEYER, W.; AANENSEN, D. M.; BOEKHOUT, T.; COGLIATI, M.; DIAZ, M. R.; ESPOSTO, M. C.; FISHER, M.; GILGADO, F.; HAGEN, F.; KAOCHAROEN, S.; LITVINTSEVA, A. P.; MITCHELL, T. G.; SIMWAMI, S. P.; TRILLES, L.; VIVIANI, M. A.;

KWON-CHUNG, J. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Medical Mycology**, v. 47, p.561-570, 2009.

MEYER, W.; GILGADO, F.; NGAMSKULRUNGROJ, P.; TRILLES, L. H.; HAGEN, F.; CASTANEDA, E.; BOEKHOUT, T. Molecular typing of the *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* species complex. In *Cryptococcus: From human pathogen to model yeast*. ASM, p. 327–357, 2011.

MEZZARI, A.; WLIBBELLING, A. M. P.; FREITAS, G. S. O.; MAY, G. G.; ALBÉ, G. C.; FILIK, H. P.; PORTICH, J. P.; KISSMANN, N.; BEHAR, P.; VILELA, R. M. M. Criptococose em um Hospital Público de Porto Alegre: dados epidemiológicos. **J Infect Control**, v. 2, p. 135-139, 2013.

MINAMI, P. S. Micologia: métodos laboratoriais de diagnóstico das micoses. **Barueri-São Paulo: Manole**, p. 199, 2003.

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

MORA, D. J.; FORTUNATO, L. R.; ANDRADE-SILVA, L. E.; FERREIRA-PAIM, K.; ROCHA, I. H.; VASCONCELOS, R. R.; et al. Cytokine Profiles at Admission Can Be Related to Outcome in AIDS Patients with Cryptococcal Meningitis. **PLoS ONE**, v. 10, 2015.

MORACE, G.; PERDONI, F.; BORGHI, E. Antifungal drug resistance in *Candida* species. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 2, p. 254-259, 2014.

NÁGARAJHA, L. D.; KAVIYIL, J. E.; NIRUJOGI, R. S.; MUTHUSAMY, B.; PUTTAMALLESH, V. N.; SUBBANNAYYA, T. Proteogenomic analysis of pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* using high resolution mass spectrometry. **Clin Proteomics**, v.11, p.5, 2014.

NAMIQ, A. L.; TOLLEFSON, T.; FAN, F. Criptococcal parotifis presenting as a cystic parotid mass: Report of a case diagnosed by fine-needle aspiration cytology. **Diagn. Cytopathol**, v. 33, p. 36-38, 2005.

NASSER, N.; NASSER FILHO, N.; VIEIRA, A. G. Criptococose cutânea primária em paciente imunocompetente. **An Bras Dermatol**, v.86, p. 1178-1180, 2011.

NAYAK, J. B.; BRAHMBHAHTT, M. N.; SAVALIA, C. V.; PAL, M.; BHANDERI, B. B. Cryptococcosis: A Garded Mycosis Threat. **Journal of Veterinary Sciences**, v. 3, p.101-112, 2010.

NEPPELENBROEK, K. H. et al. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. **Oral Diseases**, v. 20, p. 329-44, 2014.

NEUFELD, P. M. Manual de micologia médica: técnicas básicas de diagnóstico. **Rio de Janeiro: Programa Nacional de Controle de Qualidade**, p. 230, 1999.

NUCCI, M.; PERFECT, J. R. When primary antifungal therapy fails. **Clin Infect Dis**, v. 46, p. 1426-1433, 2008.

NWEZE, E. I.; KECHIA, F. A.; DIBUA, U. E.; EZE, C.; ONOJA, U. S. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from environmental samples collected in southeastern nigeria. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, 2015.

NYAZIKA, T.K.; et al.. *Cryptococcus tetragattii* as a major cause of cryptococcal meningitis among HIVinfected individuals in Harare, Zimbabwe, **Journal of Infection**, 2016.

- OKABAYASHI, K.; HASEGAWA, A.; WATANABE, T. Microreview: Capsule-associated genes of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, v. 163, p. 1-8, 2007.
- OLIVEIRA, V. B.; YAMADA, L. T.; FAGG, C. W.; BRANDÃO, M. G. L. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Res Int**, v.48, p. 170-179, 2012.
- OLSZEWSKI, M. A.; NOVERR, M. C.; CHEN, G. H.; TOEWS, G. B.; COX, G. M.; PERFECT, J. R.; HUFFNAGLE, G. B. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. **Am J Pathol**, v. 164, p.1761-1771, 2004.
- PAL, M.; DAVE, P. Cryptococcosis: A global fungal zoonosis. **Intas Polyvet**, v. 7, p. 412-420, 2006.
- PANTOJA, M. G. L.; SILVEIRA, D. M. R.; SILVA, L. D. Disseminated cryptococcosis in a immunocompetent patient: case report. **Rev. Paraense Med**, 2009.
- PARK, B. J.; et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v. 23, p. 525-530, 2009.
- PAULA, D. A. J.; ROSA E SILVA, L. K.; STAATS, C. C.; VAINSTEIN, M. H.; JOANONI, A. L. P.; NAZAKOTA, L.; DUTRA, V. Identification of genes expressed by *Cryptococcus gattii* during iron deprivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.45, 2014.
- PEDROSO, R. S. Caracterização molecular, virulência e suscetibilidade ao Fluconazol de espécies ambientais de *Cryptococcus*, antes e após inoculação em modelo murinho. **Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, São Paulo**, p. 9-16, 2008.
- PEDROSO, R. S.; CANDIDO, R. C. Diagnóstico Laboratorial da Criptococose. **NewsLab**, v. 77, p. 94-102, 2006
- PEDROSO, R. S.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C. The isolation and characterization of virulence factors of *Cryptococcus spp.* from saprophytic sources in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Microbiol Reserch**, v. 164, p. 221-227, 2009.
- PEDROSO, R. S; COSTA, K. R. C.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C.. Avaliação da produção de melanina por espécies de *Cryptococcus* em quatro diferentes meios de cultura. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v.40, 2007.
- PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; ESPINEL-INGROFF, A. Antifungal drug resistance mechanisms. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 7, p. 453-460, 2009.
- PEREIRA, T. C. D.; BARROS, R. A. M. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*: perspectivas sobre a eco-epidemiologia e novos nichos ecológicos. **Revista Facider**, v. 1, 2012.

PERFECT, J. R. Fungal diagnosis: how do we do it and can we do better? **Curr. Med. Res. Opin**, v. 29, p. 3-11, 2013.

PESSOA, C. C. B; SILVA, S. H. M; GOMES, F. S. Production of virulence factors in vitro by isolates of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* of clinical origin in Belém, Pará State, Brazil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, 2012.

PINA, G. O. Efeito alelopático do extrato aquoso foliar de *Eugenia dysenterica* DC.(Myrtaceae–cagaita) na germinação, crescimento e morfo-anatomia de *Sesamum indicum* L.(Pedaliaceae–gergelim) e *Raphanus sativus* L.(Brassicaceae–rabanete) **[Dissertation]: Universidade de Brasília**; 2008.

PINCUS, D. H.; ORENGA, S.; CHATELLIER, S. Yeast identification - past, present, and future methods. **Medical Mycology**, v. 45, p. 97-121, 2007.

POSTERARO, B.; VELLA, A.; COGLIATI, M.; CAROLI, E.; FLORIO, A. D.; POSTERARO, P.; SANGUINETTI; TORTORA, A. M. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry-Based Method for Discrimination between Molecular Types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **J. Clin. Microbiol.** v. 50, p. 2472-2476, 2012.

PROENÇA, C. E. B.; GIBBS, P. E. Reproductive biology of eight sympatric Myrtaceae from Central Brazil. **New Phytol**, v. 126, p. 343-354, 1994.

QUEIROZ, J. P. A.; SOUSA, F. D. N.; LAGE, R. A.; IZABEL, M. A.; SANTOS, A. G. Criptococose - uma revisão bibliográfica. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 2, p. 32-38, 2008.

REOLON A.; PEREZ L. R. R.; MEZZARI, A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, p. 29-33, 2004.

RIVERA, V.; GAVIRIA, M.; MUÑOZ-CADAVID, C.; CANO, L.; NARANJO, T.. Validation and clinical application of a molecular method for the identification of *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* complex DNA in human clinical specimens. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, 2015.

RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L.; MARTINEZ-SUAREZ, J. V. Fluconazole and amphotericin B antifungal susceptibility testing by National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method compared with E-test and semiautomated broth microdilution test. **J Clin Microbiol**, v. 35, p. 336-337, 1997.

ROSA E SILVA, L. K.; STAATS, C. C.; GOULART, L. S.; MORELLO, L. G.; FUNGARO, M. H. P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Identification of novel temperature-regulated genes in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* using representational difference analysis. **Reserch Microbiology**, v. 159, p. 221-229, 2008.

SALAS S. D.; BENNETT J. E.; KNOW-CHOUNG K. J.; PERFECT J. R.; WILLIAMSON P. R. Effect of the lacase gene, CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. **J Exp Med**, v. 184, p. 377-386, 1996.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Working with synthetic nucleotides probes Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., vol. 1. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.

SANCHINI, A.; et al. Molecular typing of clinical *Cryptococcus neoformans* isolates collected in Germany from 2004 to 2010. **Med. Microbiol. Immunol**, v. 203, p. 333-340, 2014.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLÖRL, *Candida* Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, p. 2-13, 2015.

SANTANGELO, R.T.; NOURI-SORKHABI, M. H.; SORRELL, T. C.; CAGNEY, M.; CHEN, S. C.; KUCHEL, P. W.; et al. Biochemical and functional characterisation of secreted phospholipase activities from *Cryptococcus neoformans* in their naturally occurring state. **J Med Microbiol**, v. 48, p. 731-740, 1999.

SANTOS J. R. A.; HOLANDA, R. A.; FRASES, S.; BRAVIM, M.; ARAUJO, G. D. S.; SANTOS, P. C.; et al. Fluconazole Alters the Polysaccharide Capsule of *Cryptococcus gattii* and Leads to Distinct Behaviors in Murine Cryptococcosis. **PLoS ONE**, v. 9, 2014.

SANTOS, L. L.; FERREIRA, F. M.; LOPES, S. F.; CONDAS, L. A.; MURO, M. D.; LUGARINI, C. Pesquisa de *Cryptococcus neoformans* e *Candida spp.* em excretas de psitacídeos e passeriformes cativos. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. Unipar, Umuarama**, v. 12, p. 5-9, 2009.

SENADIM, S.; ALPAYDIN BASLO, S.; TEKIN GÜVELI, B.; DEDEI DARYAN, M.; KANTAROGLU, E.; OZTURK, O.; ATAKLI, D. A rare cause of cerebral venous thrombosis: cryptococcal meningoencephalitis. **Neurol Sci**, 2016.

SEVERO, C. B.; GAZZONI, A. F.; SEVERO, L. S. Criptococose pulmonar. **J Bras Pneumol**, v. 35, p. 1136-1144, 2009.

SILVA, R.; CHAVES, L.; NAVES, R. Caracterização de frutos e arvores de cagaita (*Eugenia disenteria* DC) no sudeste do estado de Goiás, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, p. 330-334, 2001.

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

SOUZA, P. M. et al. Plants from Brazilian Cerrado with Potent Tyrosinase Inhibitory Activity. **Plos One**, v. 7, n. 11, p. 1-7, 2012.

SOUZA, L. K. H.; FERNANDES, O. F. L.; PASSOS, X. S.; COSTA, M.; SOUZA JÚNIOR, A. H.; SILVA, M. R. R. Comparação dos Métodos de Identificação de Leveduras por Técnicas Manuais com o Método Automatizado Microscan Rapid Yeast Identification Panel. **Revista de Patologia Tropical**, v. 30, p. 13-29, 2001.

SOUZA, P. M. et al. Plants from Brazilian Cerrado with Potent Tyrosinase Inhibitory Activity. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. 1-7, 2012.

SPRINGER, D. J.; CHATURVEDI, V.. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. **Emerg Infect Dis**, v. 16, p. 14–20, 2010.

SPITZER, E. D.; SPITZER, S. G. Use of a dispersed repetitive DNA element to distinguish clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 1094-1097, 1992.

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.

STEENBERGEN, J.N.; NOSANCHUK, J. D.; MALLIARIS, S. D.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* virulence is enhanced after growth in the genetically malleable host *Dictyostelium discoideum*. **Infection and Immunity**, v.71, p. 4862-4872, 2003.

ST GERMAIN, G.; BEAUCHESNE, D. Evaluation of the MicroScan Rapid Yeast Identification panel. **J Clin Microbiol.**, v. 29, p. 2296- 2299, 1991.

TAPIA, C.; CORREA, N. Genero *Cryptococcus*. **Revista Chilena de Infectología**, v. 31, p. 719-720, 2014.

TEODORO, V. L. I.; GULLO, F. P.; SARDI, J. C. O. S.; TORRES, E. M.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES GIANNIMI, M. J. S. Environmental isolation, biochemical identification, and antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus* species. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.46, 2013.

TELLO, M.; GUTIÉRREZ, E.; et al. Criptococosis. **Revista Médica Risaralda**, v.19, p. 147-153, 2013.

TRILLES, L.; LAZÉRA, M. S.; WANKE, B.; OLIVEIRA, R. V.; BARBOSA, G. G.; NISHIKAWA, M. M. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 455-462, 2008.

TSENG, H. K.; LIU, C. P.; HO, M, W.; LU, P.L.; LO, H.J.; LIN, Y.H.; et al. Microbiological, Epidemiological, and Clinical Characteristics and Outcomes of Patients with Cryptococcosis in Taiwan, 1997–2010. **PLoS ONE** v. 8, 2013.

VENDRÚSCOLO, G. S.; MENTZ, L. A. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Ser. Bot.**, v. 61, p. 83-103, 2006.

VERON, V.; SIMON, S.; BLAMCHET, D.; AZNAR, C. Real-time polymerase chain reaction detection of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in human samples. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 65, p. 69-72, 2009.

VICTORIA, F. N., et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 2668-2674, 2012.

XAVIER, M. O.; OLIVEIRA, F. M.; SEVERO, L. C. Diagnóstico laboratorial das micoses pulmonares. **J Bras Pneumol**, v. 35, p. 907-919, 2009.

XU, J.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T. G. Multiple gene genealogies reveal recent dispersion and hybridization in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1471-1481, 2000.

ZAITS, C. et al. **Compêndio de Micologia Médica**. 2. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN, 2010.

ZARAGOZA, O.; et al. Equatorial ring-like channels in the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. **FEMS Yeast Res.** v.6, p. 662-666, 2006.

WALRAVEN, C.J.; GERSTEIN, W.; HARDISON, S. E.; WORMLEY, F.; LOCKHART, S. R.; HARRIS, J. R.; et al. Fatal Disseminated *Cryptococcus gattii* Infection in New Mexico. **PLoS ONE**. V.6, 2011.

WANGY, J.; ZENG, Y.; LUO, W.; XIE, X.; LI, S. The Role of *Cryptococcus* in the Immune System of Pulmonary Cryptococcosis Patients. **PLoS ONE**, v.10, 2015.

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

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. **Appl Environ Microbiol**, v. 60, p. 3864-3866, 1994.

WONG, B.; PERFECT, J. R.; BEGGS, S.; WRIGHT, K. A. Production of hexitol D-mannitol by *Cryptococcus neoformans* in vitro and in rabbits with experimental meningitis. **Infection and Immunity**, v. 58, p. 1664-1670, 1990.

YAMAMURA, A. A. M.; FREIRE, R. L.; YAMAMURA, M. H.; TARODA, A.; FELIX, A. Estudo dos nichos ecológicos de leveduras patogênicas das *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* na cidade de Londrina, PR. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, p. 793-803, 2013.

7 ANEXO



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito de *Eugenia dysenterica* DC. (*Hexachlamys macedoi* Legrand) sobre isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.

Pesquisador: Yanna Karla de Medeiros Nóbrega

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 51353915.1.0000.0030

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.385.224

Apresentação do Projeto:

Ha duas especies patogenicas de *Cryptococcus*, *Cryptococcus neoformans* (sorotipo A e D) e *Cryptococcus gattii* (sorotipos B/C - *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*). Estas especies sao consideradas emergentes e cosmopolitas, encontradas principalmente no solo, em aves e em arvores. Sua transmissao ocorre atraves do sistema respiratorio e, eventualmente, e disseminado para o cerebro atraves do sistema nervoso central, atravessando a barreira encefalica, causando muita vezes meningoencefalite fatal (BAHN E JUNG, 2013; LIU et al., 2012). O *Cryptococcus gattii* e a especie, em particular, mais perigosa, por sua capacidade de atacar individuos saudaveis (Bahn e Jung, 2013). Ja o *C. neoformans* apresenta carater geralmente oportunista, sendo vinculado a presenca de imunossupressao, causada principalmente pelo virus da imunodeficiencia humana (HIV) (LIU et al., 2012). Alem do HIV, outros fatores estao associados a criptococose, entre eles: o uso de medicacoes imunossupressoras (corticosteroides, inibidores de calcineurina, agentes citotoxico e anticorpos monoclonais), transplantes de orgaos e tecidos, doencas autoimunes e outras doencas cronicas (SLOAN E PARRIS, 2014). Mundialmente, cerca de 1 milhao de casos novos de infeccoes criptococicas em individuos infectados com HIV, ocorre a cada ano, resultando em 625.000 mortes. Nos paises, onde as condicoes de saude sao extremamente precarias, como em grande parte da Africa Subsaariana, as infeccoes fatais por *Cryptococcus* spp. atingem indices

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



alarmantes, superando o número de óbitos provocados por doenças graves como a tuberculose. Entretanto, em países emergentes e desenvolvidos, o número de casos de infecções por *Cryptococcus* spp. tem reduzido nos últimos anos, fato atribuído a disponibilidade generalizada das terapias antiretrovirais (CDC, 2014). Com relação ao tratamento das infecções causadas por *Cryptococcus* spp., o número de opções terapêuticas disponíveis é bastante limitado quando comparado a gravidade e relevância para a saúde pública desta infecção. Desta forma, a aplicação de metodologias que permitam a determinação das diversidades genômicas das espécies de *Cryptococcus* spp. e a investigações de mecanismos de virulência associadas a estas espécies, tem aumentado com propósito de identificar novos alvos terapêuticos no combate da criptococose (BAHN E JUNG, 2013). Diante destas circunstâncias, estratégias farmacológicas vêm sendo utilizadas, representadas pela produção de novas formulações de antifúngicos, combinações terapêuticas entre os antifúngicos disponíveis e também terapias alternativas usando princípios ativos obtidos de fontes naturais, materiais sintéticos e materiais poliméricos (SPAMPINATO E LEONARDI, 2013). Entre as fontes naturais, os extratos de plantas são particularmente muito atrativos para a descoberta de futuros compostos terapêuticos e isto se deve principalmente a presença de diversas substâncias químicas com diferentes propriedades farmacológicas, dentre elas a atividade antifúngica (NEGRI et al., 2014). Muitos produtos naturais, tem demonstrados propriedades antifúngicas contra *Cryptococcus* spp. Recentemente, ISHIDA et al. (2014) relataram a utilização de nanopartículas de prata contra *Cryptococcus neoformans* e espécies de *Candida*. Mokoka et al. (2013) utilizaram extrato hexano da planta africana, *Maytenus undata* (Celastraceae), também demonstraram efeito inibitório contra *Cryptococcus neoformans*. Funari et al. (2012) apresentaram dados referentes a atividade de extratos, frações e compostos puros, de plantas do gênero *Lippia*, contra espécies de *Candida* e *Cryptococcus*, exibindo a potencialidade destes agentes especialmente contra *Cryptococcus neoformans*. Além disso, também foi revelada atividade anti-criptocócica de compostos isolados como triterpenos (MOKOKA et al., 2013) e flavonoides (DOS S GRECCO et al., 2014). A atividade anti-criptocócica de *Eugenia dysenterica* DC. (*Hexachlamys macedoi* Legrand) já foi demonstrada por Costa et al (2000) em seus óleos essenciais extraídos de suas folhas. Esta árvore frutífera exótica, está presente na Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (SOBRAL et al., 2013) pertencente a família Myrtaceae e é conhecida como "cagaiteira" ou "caigata" (CARDOSO et al., 2011). Os seus frutos são comumente utilizados in natura ou para obtenção de bebidas, sorvetes, sucos e geleias. Da polpa do fruto também são produzidos vinagre e álcool e suas folhas e cascas são utilizadas popularmente como anti-diarreico, para diabetes e para icterícia (JORGE et al., 2010). Quanto a suas atividades biológicas, já foram

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: ceptsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.385.224

demonstradas atividade antimicrobiana de compostos fenolicos isolados de sua semente (JORGE et al., 2010), atividade antiviral contra rotavirus atribuida a presenca de taninos, flavonoides, terpenos e saponinas isolados do extrato etanolic de folhas (CECILIO et al., 2012) e atividade antifungica por Costa et al., 2000. No entanto, a atividade biologica do extrato aquoso das folhas ainda nao foi relatado.

Metodologia: • Obtencao do material microbiologico As amostras de *Cryptococcus* spp. utilizadas neste trabalho serao cedidas pelo Nucleo de Parasitologia e Micologia (NPM) do Laboratorio Central de Saude Publica do Distrito Federal (LACEN-DF). A identificacao preliminar dos *Cryptococcus* spp. consistira em exame direto com tinta nanquim para visualizacao da capsula e/ou cultura em Agar Niger a 25oC. Apos identificacao as amostras serao mantidas viaveis para testes seguintes atraves de cultivo em agar Sabouraud a 37oC e serao congeladas em glicerol 10% a - 20oC (MINAMI, 2003).

• Identificacao por espectrometria de massa MALDI-TOF A fim de confirmar a identificacao fenotipica, os isolados de *Cryptococcus* spp. serao analisados por

espectrometria de massa na estacao de preparacao Vitek MS (BioMerieux®, Franca). Para isto, os isolados serao preparados usando metodo direto de extracao. As colonias serao aplicadas em suporte para inoculacao/identificacao (BioMerieux®, Franca) e em seguida adicionado 0,5L de acido formico (25% [vol / vol] - BioMerieux®, Franca). Apos secagem a temperatura ambiente, 1L de matriz de acido -ciano-4-hidroxicinamico (3.1% [peso / vol]) - BioMerieux, Franca) sera aplicado e seco a temperatura ambiente antes da analise por espectrometria de massa. A analise dos resultados sera realizada utilizando o banco de dados SARAMIS.

4.2. Determinacao do perfil de sensibilidade dos isolados de *Cryptococcus* spp. A determinacao do perfil de sensibilidade dos isolados de *Cryptococcus* spp., diante aos antifungicos comumente utilizados na clinica sera baseada nas normas M27-A2 (2002) do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) dos Estados Unidos da America. Esta norma descreve a tecnica de microdiluiçao em caldo, a qual fornece a concentracao inibitoria minima (CIM), apos 24 horas de incubacao e requer tambem a utilizacao de inoculo fungico (1 x 10⁶ a 5 x 10⁶ celulas de leveduras/mL); meio RMPI-1640, placas de microtitulacao esterieis de fundo chato com 96 pocos e solucoes padroes de agentes antifungicos preparadas em solventes adequados.

4.3. Teste de atividade antifungica

• Obtencao do material vegetal Para o teste de atividade antifungica sera utilizada extrato aquoso das folhas de *Eugenia dysenterica*, obtido da regio do Cerrado em Brasilia e entorno. Apos secagem em estufa com circulacao de ar, em temperatura inferior a 40 oC, o material sera pulverizado em moinho de facas e extraidos por maceracao passiva. Apos extracao a quase

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.385.224

completo esgotamento, as soluções extrativas obtidas serão concentradas em rotavapor a temperatura inferior a 40 °C (CORREIA et al., 2008).

• **Teste da Atividade Antifúngica** As técnicas usadas no teste da atividade antifúngica para o extrato serão: disco difusão e microdiluição em caldo. As etapas para a realização da técnica de disco difusão consistem em: preparação da solução do extrato a ser testado (concentração final de 100 mg/mL); preparação dos discos de papel, onde serão impregnados a solução do extrato; preparação do inóculo fúngico (1 x 10⁶ a 5 x 10⁶ células de leveduras/mL) e aplicação dos discos no agar Mueller-Hinton. A realização da técnica de microdiluição será de acordo com a norma M27-A2 (2002) do CLSI, com a seguinte modificação: os agentes antifúngicos serão substituídos pelos extratos brutos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral: Avaliar o efeito inibitório de extrato aquoso das folhas de *Eugenia dysenterica* DC. (*Hexachlamys macedoi* Legrand) sobre isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. **Objetivos específicos:** Confirmar, por espectrometria de massa - MALDI-TOF, a identificação fenotípica dos diferentes isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.

Determinar o perfil de sensibilidade de isolados de *Cryptococcus* spp. frente aos antifúngicos comumente utilizado na clínica; Testar extrato aquoso das folhas de *Eugenia dysenterica* quanto a atividade inibitória frente aos isolados de *Cryptococcus* spp.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com os pesquisadores, os doadores fontes de onde estes materiais clínicos serão isolados não terão sua identidade revelada, e esta doação de material não acarretará nenhum risco direto.

Este projeto tem como foco avaliar o efeito da *Eugenia dysenterica* sobre *Cryptococcus* spp. que são fungos patogênicos com elevada incidência no país. A *Eugenia dysenterica*, assim como várias outras plantas do cerrado brasileiro, são fontes de compostos químicos com atividade biológica variáveis com grande potencialidade para o desenvolvimento de novos fármacos. Assim, espera-se que a determinação do efeito inibitório de *E. dysenterica* sobre o *Cryptococcus* spp. seja o primeiro passo no desenvolvimento de fitoterápicos ou na identificação de metabólitos secundários, com atividades antifúngicas, que poderão ser utilizados como matéria-prima para novos fármacos. Almeja-se também caracterizar de forma mais específica as espécies de *Cryptococcus* e traçar seu perfil de susceptibilidade aos antifúngicos comumente utilizado na clínica. Isto contribuirá para o melhor entendimento da patologia causada por este microorganismo, bem como para descrição rápida e precisa de novos patógenos emergentes, para

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.385.224

o sucesso terapêutico e subsequente redução das taxas de morbidade e mortalidade causadas pela criptococose.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A presente pesquisa é referente ao projeto de mestrado do Jorge Antonio Chamon Junior sob a orientação da Profa. Dra. Yanna Karla de Medeiros Nobrega apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília. Trata-se de um estudo *in vitro* que visa Avaliar o efeito inibitório de extrato aquoso das folhas de *Eugenia dysenterica* DC. (*Hexachlamys macedoi* Legrand) sobre isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.

O documento que contém o projeto encontra-se ainda com as correções sugeridas pela orientadora. Ainda, foi solicitado a dispensa do TCLE, uma vez que, isolados clínicos de *Cryptococcus* spp., provenientes de materiais biológicos de pacientes com suspeita clínica de criptococose, atendidos nas unidades de saúde da rede públicas do Distrito Federal serão provenientes do LACEN-DF. Segundo os autores, o LACEN-DF garante sigilo absoluto dos resultados, tornando-se detentor das amostras. Neste projeto não serão utilizados dados referentes aos pacientes, não acarretando nenhum risco aos mesmos. No entanto, não foi apresentado nenhum documento que comprove a colaboração com o Núcleo de Parasitologia e Micologia (NPM) do Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram utilizados os seguintes documentos para emissão do presente parecer:

- 1- Informações Básicas do Projeto: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_533004.pdf, postado em 04/01/2016;
- 2- Termo_concordancia_LACEN.pdf, postado em 04/01/2016
- 3- Resposta_ao_Parecer_Consubstanciado_emitido_pelo_CEP_29_12_15.docx, postado em 29/12/2015;
- 4- Projeto Detalhado / Brochura Investigador: Projeto_Jorge_Chamon_revisado_29_12_15.doc, postado em 29/12/2015.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Solicita-se:

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.385.224

1- O documento contendo o projeto encontra-se ainda em fase de estruturacao, uma vez que a versao encaminhada ao CEP esta com correcoes ao longo do texto. Solicita-se ajustar esse documento.

PENDÊNCIA ATENDIDA

2 - Nao foi apresentado nenhum documento que comprove a colaboracao com o Nucleo de Parasitologia e Micologia (NPM) do Laboratorio Central de Saude Publica do Distrito Federal (LACEN-DF). Solicita-se apresentar termo de ciencia dessa colaboracao.PENDÊNCIA ATENDIDA

3 - Inserir o LACEN como instituicao co-participante na Plataforma Brasil de forma que esteja vinculado ao CEP-FEPECS.PENDÊNCIA ATENDIDA

4 - De acordo com o cronograma de execucao, o projeto ja foi iniciado, solicita-se esclarecer. PENDÊNCIA ATENDIDA

5 - Solicita-se esclarecer se o presente projeto tera acesso ao material biologico do individuo ou apenas ao isolado clinico do criptococos. PENDÊNCIA ATENDIDA

As pendências foram sanadas não existindo óbices éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com a Resolução 466/12 CNS, itens X.1. - 3.b. e XI.2.d, os pesquisadores responsáveis deverão apresentar relatórios parcial semestral e final do projeto de pesquisa, contados a partir da data de aprovação do protocolo de pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_533004.pdf	04/01/2016 17:56:24		Aceito
Outros	Termo_concordancia_LACEN.pdf	04/01/2016 17:45:15	Yanna Karla de Medeiros Nóbrega	Aceito
Outros	Resposta_ao_Parecer_Consubstanciado_emitido_pelo_CEP_29_12_15.docx	29/12/2015 13:05:44	Yanna Karla de Medeiros Nóbrega	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Jorge_Chamon_revisado_29_12_15.doc	29/12/2015 13:04:48	Yanna Karla de Medeiros Nóbrega	Aceito
Orçamento	orcamento_projeto.pdf	27/11/2015 09:44:52	Yanna Karla de Medeiros Nóbrega	Aceito
Outros	carta_encaminhamento_projeto.pdf	27/11/2015 09:42:58	Yanna Karla de Medeiros Nóbrega	Aceito
Outros	Termo_responsabilidade_yanna.pdf	27/11/2015 09:42:25	Yanna Karla de Medeiros Nóbrega	Aceito

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
UF: DF Município: BRASILIA
Telefone: (61)3107-1947

E-mail: ceptsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.385.224

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Jorge_Chamon.doc	20/11/2015 11:59:53	Yanna Karla de Medeiros Nóbrega	Aceito
Outros	Termo_responsabilidade_Amabel.pdf	20/11/2015 11:54:40	Yanna Karla de Medeiros Nóbrega	Aceito
Outros	Termo_responsabilidade_Jorge.pdf	20/11/2015 11:54:15	Yanna Karla de Medeiros Nóbrega	Aceito
Outros	Lattes_Jorge.pdf	20/11/2015 11:50:25	Yanna Karla de Medeiros Nóbrega	Aceito
Outros	Lattes_Amabel.pdf	20/11/2015 11:50:02	Yanna Karla de Medeiros Nóbrega	Aceito
Outros	Lattes_Yanna.pdf	20/11/2015 11:49:37	Yanna Karla de Medeiros Nóbrega	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinada_final.pdf	20/11/2015 11:44:28	Yanna Karla de Medeiros Nóbrega	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 07 de Janeiro de 2016

Assinado por:
Keila Elizabeth Fontana
(Coordenador)

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com