

# FATORES DE VIRULÊNCIA E SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE *Cryptococcus* spp.

Flávia Franco Veiga<sup>1</sup>  
Joice dos Santos César<sup>2</sup>  
Isabele Carrilho Jarros<sup>3</sup>  
Melyssa Negri<sup>4</sup>

VEIGA, F. F.; CÉZAR, J. dos S.; JARROS, I. C.; NEGRI, M. Fatores de virulência e susceptibilidade a antifúngos de *Cryptococcus* spp. *Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR*, Umuarama, v. 24, n. 1, p. 3-7, jan./abr. 2020.

**RESUMO:** Criptococose é uma doença grave que afeta tanto imunocomprometidos quanto imunocompetentes, com isso analisar a virulência é fundamental para novas terapêuticas. **Objetivo:** Analisar a capacidade de virulência e susceptibilidade aos antifúngicos de *Cryptococcus* spp. isolados de líquor de pacientes de hospital do norte do Paraná. **Métodos:** A partir de dois isolados clínicos *C. neoformans* e *C. gattii*, realizou-se a confirmação da identificação. Para a virulência, avaliou-se o tamanho da cápsula, capacidade de sobrevivência após exposição a neutrófilos, produção de melanina e urease. No antifungograma por difusão em disco utilizou-se: anfotericina B, cetoconazol, voriconazol, itraconazol e miconazol. **Resultados:** *C. gattii* destaca-se por maior desenvolvimento da cápsula além da melhor capacidade de sobreviver a fagocitose em relação ao *C. neoformans*. No antifungograma, ambos os isolados se apresentam sensíveis às drogas estudadas. **Conclusão:** Esses achados contribuem para a compreensão das diferentes patogêneses entre *C. gattii* e *C. neoformans*. **PALAVRAS-CHAVE:** Cápsula. Fagocitose. Levedura.

## VIRULENCE FACTORS AND SUSCEPTIBILITY TO *Cryptococcus* spp. ANTIFUNGALS

**ABSTRACT:** Cryptococcosis is a serious disease that can affect both immunocompromised and immunocompetent individuals, thus the virulence analysis is fundamental for the development of new treatments. **Objective:** To analyze the virulence and susceptibility of *Cryptococcus* spp. isolated from cerebrospinal fluid of patients from a hospital in the north of Paraná. **Methods:** From two clinical isolates, *C. neoformans* and *C. gattii* were confirmed and identified. For virulence, capsule size, survival capacity after exposure to neutrophils, melanin production and urease were evaluated. In the disc-diffusion method, the following antifungals were used: amphotericin B, ketoconazole, voriconazole, itraconazole and miconazole. **Results:** It was observed that *C. gattii* presents greater results for development of the capsule beside presenting the best ability to survive phagocytosis in relation to *C. neoformans*. In the disc-diffusion method, both isolates presented sensitivity to the studied drugs. **Conclusion:** These findings contribute to the understanding of the different pathogens between *C. gattii* and *C. neoformans*.

**KEYWORDS:** Yeast. Capsule. Phagocytosis.

### Introdução

A criptococose é considerada uma doença grave que afeta principalmente pacientes imunocomprometidos. Contudo, surtos de criptococose na América do Norte e Canadá, envolvendo indivíduos saudáveis, tem chamado a atenção de pesquisadores, pois trata-se de linhagens que possuem capacidade para atuar como patógenos primários (MAY *et al.*, 2016). Os principais agentes etiológicos responsáveis pela criptococose são as leveduras *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (KWON-CHUNG *et al.*, 2014).

A infecção geralmente resulta da inalação das partículas infecciosas transportadas pelo ar. Essas leveduras podem ser encontrados na natureza em ocos de árvores, vegetais, frutas em decomposição e principalmente em fezes de aves (LACAZ *et al.*, 2002). Devido ao seu tamanho, pode ser transportado para pulmão, e entrar em contato com células dendríticas ou macrófagos. Se a resposta imune gerada não for suficiente para controlar a infecção, as leveduras podem migrar pela corrente sanguínea e atravessar a barreira hematoencefálica, chegando ao sistema nervoso central, podendo levar ao desenvolvimento de pneumonia e meningoencefalite (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014). Além disso, estudos já relataram a capacidade de *Cryptococcus* spp. de sobreviver dentro de macrófagos (ROSSI; ZARAGOZA,

2017).

Como patógenos essas leveduras possuem uma característica marcante, uma cápsula de polissacarídeo que pode causar danos ao hospedeiro. Esta pode mudar sua estrutura, densidade e acumular melanina suficiente para aumentar sua virulência. Uma vez dentro de um hospedeiro o fungo pode levar ao crescimento de células, formando “células titânicas”, que facilitam sua invasão (ROSSI; ZARAGOZA, 2017).

Estudos já identificaram a presença de *C. neoformans* em crianças imunocompetentes, levantando um fator essencial para o estudo do fungo, a capacidade de latência dos mesmos nas células hospedeiras, supondo que a maioria dos casos clínicos encontrados possam representar uma reativação da infecção quando o sistema imune do indivíduo encontra-se debilitado (GOLDMAN *et al.*, 2001). Almeida, Wolf e Casadevall (2015) listaram como fatores de virulência para leveduras do gênero *Cryptococcus*, a cápsula polissacarídica, melanina, fosfolipase, urease, proteinase e crescimento a temperatura corporal de mamíferos (37 °C). A melanina apresenta a função de proteção contra situações de estresse e só é produzida na presença de substratos específicos como 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) ou outros compostos dipolifenólicos. Tanto a urease, quanto a fosfolipase B são enzimas de degradação que desempenham um papel importante

DOI: 10.25110/arqsaude.v24i1.2020.7378

<sup>1</sup>Laboratório de Micologia Médica. Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina. Universidade Estadual de Maringá. Email: flaviafveiga@gmail.com

<sup>2</sup>Laboratório de Micologia Médica. Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina. Universidade Estadual de Maringá. Email: joicezar@hotmail.com

<sup>3</sup>Laboratório de Micologia Médica. Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina. Universidade Estadual de Maringá. Email: belecj@gmail.com

<sup>4</sup>Laboratório de Micologia Médica. Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina. Universidade Estadual de Maringá. Email: melyssanegri@gmail.com

na patogenicidade do *Cryptococcus* spp., auxiliando na sua sobrevivência intracelular e migração do fungo do pulmão para o cérebro (KWON-CHUNG *et al.*, 2014).

A taxa global de pacientes com criptococose é estimada em 1 milhão de casos por ano, e aproximadamente 70% de mortes por ano (KWON-CHUNG *et al.*, 2014). Em todo o Brasil, *C. neoformans* é a maior causa da doença, enquanto *C. gattii* é crescente e endêmica para os estados do Norte e Nordeste, com letalidade de 30 a 40%. Entretanto, é importante ressaltar que *C. neoformans* acomete mais imunocomprometidos, principalmente pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) (MARTINS *et al.*, 2011). Assim, este estudo teve como objetivo identificar espécies de *Cryptococcus* isoladas de líquido de pacientes atendidos em um hospital da região norte do Paraná, analisar e comparar a capacidade de virulência e susceptibilidade desses isolados a antifúngicos convencionais.

## Metodologia

### Reativação e confirmação da identidade dos isolados

Foram utilizados neste estudo dois isolados clínicos identificados como *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*, ambos isolados do líquido de pacientes internados no Hospital Universitário de Maringá (HUM) com criptococose. Os fungos foram recuperados do espécime clínico e mantidos em Sabouraud Dextrose ágar (SDA, Difco™, EUA) a 35 °C, e, posteriormente à recuperação e confirmação da identificação, os isolados foram semeados em caldo Sabouraud Dextrose (SDB; Merck, Darmstadt, Alemanha) acrescido de 15% de glicerol e congelados a -80 °C, compondo atualmente parte da micoteca do Laboratório de Micologia da Médica da Universidade Estadual de Maringá. A confirmação da identificação dos isolados foi segundo métodos clássicos de identificação de leveduras, utilizando tinta da China (Trident®, BR) para observação de caracteres morfológicos específicos de *Cryptococcus* spp.. A diferenciação das espécies foi realizada semeando o fungo em ágar L-canavanina; glicina; azul de bromotimol (CGB) (DE HOOG *et al.*, 2018).

### Avaliação dos fatores de virulência

Para visualizar a formação e mensurar a cápsula criptococócica foi utilizado o método descrito por Lacaz *et al.*, (2002) com algumas modificações. As leveduras foram semeadas em ágar chocolate, base Mueller-Hinton (Difco™, EUA), e incubadas a 35 °C por 24 horas. Uma colônia isolada foi colocada sobre uma lâmina com tinta da China seguida da análise em microscópio ZEISS® (software AxioVision 4.6™) acoplado a uma câmera utilizando o software Axio-Vision 4.6™.

A produção de melanina foi avaliada diluindo uma colônia da levedura em salina (0,85% NaCl; pH 7,2), em seguida semeado em ágar Níger, ágar semente de níger é um meio seletivo e diferencial para *Cryptococcus* spp., método descrito por Lacaz *et al.*, (2002) e incubado a 30 °C por sete dias. Após este período foi verificado se houve o aparecimento de pigmentação nas colônias. Para o teste de urease uma colônia foi semeada em tubo contendo meio de ureia (BD®, USA) e incubado a 25 °C por um período de 3 a 7 dias. A capacidade de crescimento a 37 °C foi avaliada cultivando as leveduras em SDA em incubando a 37 °C por sete dias.

Foram avaliados a capacidade de sobrevivência dos isolados após exposição a neutrófilos em diferentes tempos (0, 30, 60 e 120 minutos) com modificações de Bomfim-Mendonça *et al.*, (2014). Os neutrófilos totais foram obtidos de voluntários saudáveis e submetidos a centrifugação sobre um gradiente de Ficoll-Hypaque. Os neutrófilos (2 x 10<sup>6</sup> Células/mL) foram ressuspensos em RPMI Medium 1640 (Gibco®, EUA). O inóculo dos isolados foi ajustado para 2 x 10<sup>7</sup> células/mL, e colocado em contato com os neutrófilos. As amostras foram incubadas a 37 °C sob agitação lenta por diferentes tempos (0, 30, 60 e 120 minutos). Após cada período, as amostras foram diluídas na proporção de 1:2 em água destilada estéril, e passadas em vórtex para lise dos neutrófilos, em seguida diluídas de forma seriada até 1:100 em soro fisiológico estéril e semeadas cada diluição em SDA e incubadas a 37 °C por 24 horas para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC).

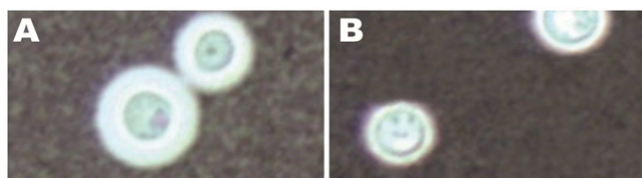
### Atividade antifúngica contra *Cryptococcus* spp.

O teste de sensibilidade aos antifúngicos foi realizado por meio do teste de difusão em disco (DD), de acordo com Pfaller *et al.*, (2004) e o documento M44-A do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009). Foram utilizados discos de anfotericina B (100 µg), cetoconazol (50 µg), itraconazol (100 µg), miconazol (50 µg), obtidos do Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico (CECON, LTDA São Paulo, Brasil) e voriconazol da Oxoid *and* Remel *Microbiology Products* (OXOID, LTDA Cambridge, Inglaterra). Foi preparado um inóculo em solução salina a 0,8% a partir de uma colônia isolada do meio SDA e semeado em placas de ágar Mueller-Hinton (Difco™, USA) suplementado com 2% de glucose e azul de metileno (0,5 µg/ml) e incubadas a 35 °C por 48 horas com os devidos discos contendo antifúngicos. Após o período de incubação, o diâmetro da zona inibitória (dz) foi mensurado com uma régua. O critério interpretativo utilizado para o teste do disco dos antifúngicos segundo Pfaller *et al.*, (2004) e o CLSI M44-A, sendo R: resistente; DD: dose dependente e; S: sensível. Os valores foram: itraconazol, dz ≥ 20 mm—S, 12 < dz < 19 mm—S-DD, dz ≤ 11 mm—R; anfotericina B, dz ≤ 10 mm—R; voriconazol, dz ≥ 17 mm—S, dz ≤ 14-16 mm—S-DD, dz ≤ 13 mm—R; cetoconazol, dz > 20 mm—S, dz ≤ 10-20 mm—S-DD, dz < 10 mm—R; miconazol, dz > 20 mm—S, dz ≤ 10-20 mm—S-DD, dz < 10 mm—R.

## Resultados

No teste de tinta da China foi observada a presença de cápsulas ao redor da levedura, sugestivo de *Cryptococcus* spp. Nesses isolados reativados foi confirmada a identificação por meio do método clássico de identificação de leveduras. A distinção entre espécies foi auxiliada através do ágar CGB. As amostras foram confirmadas como uma sendo *Cryptococcus gattii* e a outra *Cryptococcus neoformans*.

A cápsula mensurada (Figura 1) demonstrou que *C. gattii* possui uma cápsula de maior diâmetro (com valor médio de 3,48 µm), se comparado ao isolado de *C. neoformans* que apresentou diâmetro menor (com valor médio de 2,73 µm).

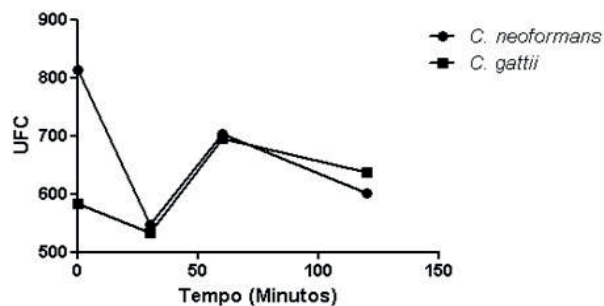


**Figura 1:** Imagem ilustrativa para mostrar a mensuração das cápsulas como fator de virulência. A) *Cryptococcus gattii* apresentou diâmetro de  $3,48 \pm 1,13 \mu\text{m}$ . B) *Cryptococcus neoformans* com diâmetro de  $2,73 \pm 0,8 \mu\text{m}$ .

Em relação aos fatores de virulência analisados, ambas cepas mostraram-se positivas quando expostas a meio Niger para avaliação da produção de melanina, onde as colônias apresentaram coloração amarronzada. Ainda, ambos os isolados foram capazes de metabolizar a uréia, dentro do período de tempo estipulado (3 a 7 dias), conferindo ao meio uma coloração rosácea. Outro importante fator de virulência, a capacidade de crescimento a  $37^\circ\text{C}$ , apresentou resultados positivos para as duas espécies.

Os resultados da avaliação da capacidade de sobrevivência de *Cryptococcus* spp. após diferentes tempos de exposição a neutrófilos estão apresentados na Figura 2. Após cada tempo (0, 30, 60 e 120 minutos) foram realizados o plaqueamento das amostras, em triplicata. Em 30 minutos, observa-se uma queda brusca na contagem de células viáveis de *C. neoformans* (67% de sobrevivência) quando com-

parado ao inóculo inicial, o que não ocorreu de forma tão acentuada no caso de *C. gattii* (91% de sobrevivência). Em 60 minutos houve um aumento das unidades formadoras de colônia demonstrando a capacidade de sobrevivência e reprodução dos isolados na presença de neutrófilos saudáveis. Nesse tempo, a sobrevivência *C. gattii* foi superior ao tempo 0 e *C. neoformans* de 86%. Após 120 minutos, a espécie *C. gattii* obteve 100% de sobrevivência, enquanto a espécie *C. neoformans* obteve 73% de sobrevivência.



**Figura 2:** Sobrevida de *Cryptococcus* spp. após exposição aos polimorfonucleares nos tempos de 0, 30, 60 e 120 minutos.

Na avaliação da susceptibilidade aos antifúngicos, avaliados através do antifungigrama, ambos os isolados demonstram-se sensíveis às drogas testadas. (Tabela 1).

**Tabela 1:** Susceptibilidade aos antifúngicos por difusão em disco de *Cryptococcus* spp. isolados de pacientes com meningite fúngica, sendo medido o halo de inibição em milímetros (mm).

Antifúngicos (concentração)	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	Valores de referência
Anfotericina B (100 µg)	34,5 mm	25,5 mm	S > 10 mm
Cetoconazol (50 µg)	45 mm	46 mm	S > 20 mm
Itraconazol (100 µg)	22,5 mm	20,5 mm	S ≥ 20 mm
Voriconazol (1 µg)	40 mm	34 mm	S ≥ 17 mm
Miconazol (50 µg)	35 mm	30 mm	S > 20 mm

\*Valores de referência de acordo com Pfaller *et al.* 2004 e o documento M44-A do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). S= sensível.

## Discussão

Este estudo avaliou o perfil de susceptibilidade e fatores de virulência de culturas de *Cryptococcus* spp. isoladas do líquido de pacientes internados no Hospital Universitário de Maringá (HUM). *Cryptococcus* spp. são fungos cosmopolitas e responsáveis por infecções que se iniciam no sistema respiratório e podem se disseminar para outros locais, sobretudo para o sistema nervoso central, sendo a causa principal de meningoencefalite subaguda, onde a alta pressão intracraniana desempenha um papel especialmente deletério e quando não tratada, é letal (WILLIAMSON *et al.*, 2017; SULLIVAN; MORAN; COLEMAN, 2017).

A patogenicidade pode ser caracterizada como a capacidade do micro-organismo em causar danos ao hospedeiro. Os fatores que contribuem para a patogenicidade dos *Cryptococcus* spp. são: capacidade de crescimento à  $37^\circ\text{C}$ , produção de melanina, urease e desenvolvimento de cápsula polissacarídica (TAKAHARA, 2011).

A melanina da parede celular desempenha funções essenciais ao fungo, protegendo a célula fúngica do estresse oxidativo e outras ações químicas (PACELLI *et al.*, 2017). A urease é uma enzima que catalisa a hidrólise da uréia em amônia, aumentando o pH do local infectado, interferindo na comunicação com células endoteliais e favorecendo a adesão e toxicidade do fungo. Estudos demonstram que isolados de *C. neoformans* urease-negativas raramente causam infecções em humanos, embora a grande maioria dos isolados clínicos produzam grandes quantidades de urease, sendo uma importante e rápida prova de identificação para *C. neoformans* (KONG *et al.*, 2017). No presente estudo, os dois isolados apresentaram resultados positivos para os fatores de virulência citados acima. Estes resultados corroboram com os obtidos por Matos *et al.*, (2011), durante a avaliação dos fatores de virulência de 62 isolados de *Cryptococcus* spp. oriundos de casos de meningite na Bahia, onde todos os isolados apresentaram a habilidade de crescimento a  $37^\circ\text{C}$  e produção de melanina, sendo detectada a ausência da enzima urease em

apenas um dos isolados de *C. gattii*. Um estudo realizado no Pará com amostras do líquido cefalorraquidiano provenientes da rotina do Laboratório de Micologia da Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI) do Instituto Evandro Chagas (IEC) obteve resultados positivos ao avaliar a atividade de urease, melanina e produção da cápsula (GOMES *et al.*, 2010).

Neste estudo a maior cápsula criptocócica foi encontrada na espécie *C. gattii*, em comparação a cápsula formada por *C. neoformans*. Corroborando a esses resultados, quando avaliada a capacidade de sobrevivência frente a exposição aos neutrófilos, encontramos maior resistência sobre a espécie de *C. gattii*, demonstrando assim maior virulência em relação a outra espécie estudada. A cápsula polissacarídica é composta por glucurono e galactoxilomanana, e podem bloquear a ação das células fagocitárias (SULLIVAN; MORAN; COLEMAN, 2017), como neutrófilos, acarretando na diminuição da resposta imunológica, em decorrência do potencial zeta negativo dos constituintes da cápsula, que provocam a repulsão eletrostática, diminuindo a apresentação dos antígenos a células T (BUCHANAN, 1998). Portanto, a cápsula influencia significativamente o processo de disseminação ou eliminação do fungo pelo hospedeiro. Uma cápsula grande compromete significativamente a fagocitose, sendo neste caso, os fragmentos C3 da cadeia do complemento, que proporcionam a opsonização, encontradas em menor quantidade do que na presença de uma cápsula pequena (RABELO, 1999).

Para o antifungograma, ambos os isolados se apresentaram sensíveis a todos os antifúngicos estudados, dado este observado também observado por Martins *et al.*, (2011). Contudo, é importante ressaltar que apesar de sensíveis aos antifúngicos, estes isolados mostraram capazes de produzir melanina e resistir a fagocitose. Estudos mais recentes relatam isolados clínicos resistentes clinicamente aos antifúngicos de escolha para o tratamento, como o fluconazol, anfotericina B e as equinocandinas em geral (COELHO; CASADEVALL, 2016; NASRI *et al.*, 2016; ROSSI *et al.*, 2016). A possível explicação para esta resistência antifúngica pode estar ligada a melanização fúngica no cérebro do hospedeiro, pois a melanina associada a parede celular pode impedir que a droga atinja seu alvo enzimático no fungo, sendo demonstrada por estudos que a melanina é capaz de absorver equinocandinas e reduzir a permeabilidade da parede celular (ALTHAUS *et al.*, 2015; SCEMLA *et al.*, 2015).

## Conclusão

Deste modo, concluímos que *C. gattii* utilizado neste estudo, destaca-se por grande desenvolvimento da cápsula além de uma maior capacidade de sobrevivência à fagocitose em relação ao *C. neoformans*, apresentando assim maior virulência e provavelmente dificuldade no tratamento do indivíduo infectado por este agente.

## Comitê de ética em pesquisa

O presente estudo foi aprovado pelo comitê permanente de ética em pesquisa envolvendo seres humanos (COPEP) parecer nº 615.643, e pelo Centro de Assessoria Técnica Científica do HUM, sob o parecer nº CAA 18050313.70000.0104.

## Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## Referências

- AGUIAR, P. A. D. F. de *et al.* The epidemiology of cryptococcosis and the characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated in a Brazilian University Hospital. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, p. 1-9, 2017.
- ALMEIDA, F.; WOLF, J. M.; CASADEVALL, A. Virulence-associated enzymes of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic cell**, v. 14, n. 12, p. 1173-1185, 2015.
- ALTHAUS, V. A. *et al.* Espécies de *Candida* spp. em isolados clínicos e suscetibilidade a antifúngicos de uso hospitalar. **Saúde e Pesquisa**, v. 8, n. 1, p. 7, 2015.
- BONFIM-MENDONÇA, P. de S. *et al.*  $\beta$ -Glucan induces reactive oxygen species production in human neutrophils to improve the killing of *Candida albicans* and *Candida glabrata* isolates from vulvovaginal candidiasis. **PLoS one**, v. 9, n. 9, p. e107805, 17, 2014.
- BUCHANAN, K. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? **Emerging infectious diseases**, v. 4, n. 1, p. 71-83, 1998.
- COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. The intracellular life of *Cryptococcus neoformans*. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 9, n. 1, p. 219-238, 2014.
- COELHO, C.; CASADEVALL, A. Cryptococcal therapies and drug targets: the old, the new and the promising. **Cellular microbiology**, v. 18, n. 6, p. 792-799, 2016.
- DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; FIGUERAS, M. J. Atlas of clinical fungi: the ultimate bench tool for diagnostics. 4 ed. (online v. 4.1.4). **Utrecht, NL: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre**, 2018.
- GOLDMAN, D. L. *et al.* Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. **Pediatrics**, v. 107, n. 5, p. E66, 2001.
- GOMES, F. S. *et al.* Quimiotipagem e caracterização fenotípica de *Cryptococcus* isolados em Belém, Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 4, p. 43-49, 2010.
- KONG, Q. *et al.* Transcriptomic and virulence factors analyses of *Cryptococcus neoformans* hypoxia response. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 125, n. 3, p. 236-248, 2017.
- KWON-CHUNG, K. J. *et al.* *Cryptococcus neoformans* and

- Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of Cryptococcosis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 7, p. a019760-a019760, 2014.
- LACAZ, C. DA S. *et al.* Primary cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype B, in an immunocompetent patient. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 4, p. 225-228, 2002.
- MARTINS, L. M. S. *et al.* Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piauí (northeastern Brazil). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 6, p. 725-730, 2011.
- MAY, R. C. *et al.* *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature reviews. Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 106-117, fev. 2016.
- NASRI, H. *et al.* Retrospective study of cryptococcal meningitis with elevated minimum inhibitory concentration to fluconazole in immunocompromised patients. **Open forum infectious diseases**, v. 3, n. 2, p. ofw076, 2016.
- PACELLI, C. *et al.* Melanin is effective in protecting fast and slow growing fungi from various types of ionizing radiation. **Environmental microbiology**, v. 19, n. 4, p. 1612-1624, 2017.
- PFALLER, M. A. *et al.* Evaluation of the NCCLS M44-P disk diffusion method for determining susceptibilities of 276 clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* to fluconazole. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 1, p. 380-383, 2004.
- ROSSI, S. A. *et al.* Impact of resistance to fluconazole on virulence and morphological aspects of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 153, 2016.
- ROSSI, S. A.; ZARAGOZA, O. Infections by *Cryptococcus* species. *In: Reference Module in Life Sciences*. 2017. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/313584089\\_Infections\\_by\\_Cryptococcus\\_species](https://www.researchgate.net/publication/313584089_Infections_by_Cryptococcus_species). Acesso em: 16 set. 2019.
- SCEMLA, A. *et al.* Dramatic improvement of severe cryptococcosis-induced immune reconstitution syndrome with adalimumab in a renal transplant recipient. **American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons**, v. 15, n. 2, p. 560-564, 2015.
- SULLIVAN, D. J.; MORAN, G. P.; COLEMAN, D. C. Fungal infections of humans. *In: Fungi*. 2. ed. p. 384, 2011.
- WILLIAMSON, P. R. *et al.* Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. **Nature reviews. Neurology**, v. 13, n. 1, p. 13-24, 2017.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; Approved Guideline, 2 ed. **CLSI document M44**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009.
- MATOS, C. S. **Caracterização molecular e perfil de suscetibilidade de *Cryptococcus* e outras leveduras melanizadas de ambiente contaminado com fungicidas azólicos**". 2011. 100f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Faculdade de Farmácia - Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2011.
- RABELO, L. M. **Estudos morfológicos da cápsula do *Cryptococcus neoformans* e sua relação com o número de linfócitos CD4**. 1999. 63f. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.
- TAKAHARA, D. T. **Isolamento e identificação de *Cryptococcus neoformans* a partir de excretas de pombos provenientes de locais públicos e residenciais de Cuiabá e Várzea Grande-MT**. 2011. 122f. (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2011.

Recebido: 18-02-2019

Aceito: 03-02-2020