

Como citar esse artigo:

Cavalcante FBL, Ferreira TC. MECANISMOS DE VIRULÊNCIA DO CRYPTOCOCCUS SPP E OS DESAFIOS NO TRATAMENTO DA CRIPTOCOCOSE. Anais do 24º Simpósio de TCC do Centro Universitário ICESP. 2022(24); 645-656.

Francisca Beatriz Lima Cavalcante
Túlio César Ferreira

Resumo

Introdução: A criptococose é uma infecção causada pelos agentes *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. É considerada uma infecção grave que atinge tanto os seres humanos como animais. O *Cryptococcus neoformans* causa infecções graves em pacientes imunocomprometidos. Já o *Cryptococcus gattii* acomete os indivíduos imunocompetente. O ciclo de infecção do *Cryptococcus* ocorre por meio da via respiratória, devido a inalação dos propágulos do *Cryptococcus*, por meio de fontes ambientais, como madeira em decomposição, excretas de aves, principalmente de pombos, folhas, ar, solo e flores. Órgãos mais afetados na infecção são os pulmões e cérebro. No caso de infecção no cérebro, resulta em meningite criptocócica, que pode levar a óbito. Infecções em pessoas saudáveis são raras. Normalmente, é comum infecções de criptococose em indivíduos infectados pelo HIV. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho é descrever sobre os principais fatores de virulências presentes no *Cryptococcus spp* e abordar os principais desafios no tratamento da criptococose. **Materiais e Métodos:** Esta pesquisa é uma revisão bibliográfica e, para sua execução, teve como suporte as bases de dados SciELO, Google Acadêmico e PubMed. Foram selecionados artigos de 1991 a 2022. Os critérios de inclusão foram artigos cuja temática fosse referente ao tema da pesquisa. **Conclusão:** A criptococose é uma doença grave, principalmente para pessoas imunocomprometidas. Por isso, é importante buscar novas perspectivas para o tratamento. Atualmente, estão sendo desenvolvidas algumas pesquisas com o objetivo de descobrir novos fármacos para tratamento da criptococose. Porém, o número de estudos voltados para esse objetivo não é grande e alguns desses não são exclusivos para a criptococose. Além disso, uma das principais estratégias é aproveitar fármacos já conhecidos para o tratamento da criptococose, ao invés de focar na descoberta de novos compostos.

Palavras-Chave: 1. *Cryptococcus neoformans*; 2.resistência aos antifúngicos; 3.alvos terapêuticos; 4.criptococose.

Abstract

Introduction: Cryptococcosis is an infection caused by the agents *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. It is considered a serious infection that affects both humans and animals. O. *Cryptococcus neoformans* causes serious infections in immunocompromised patients. *Cryptococcus gattii*. affects immunocompetent individuals. The cycle of *Cryptococcus* infection occurs through the respiratory route due to inhalation of *Cryptococcus* propagules through environmental sources such as decaying wood, bird excreta mainly from pigeons, leaves, soil and flowers. The most affected organs in the infection are the lungs and brain. In the case of infection in the brain, it results in cryptococcal meningitis that can lead to death. **Objective:** The objective of this work is to describe the main virulence factors present in *Cryptococcus spp* and address the main challenges in the treatment of cryptococcosis. **Materials and Methods:** This research is a bibliographic review and for its execution it was supported by the SciELO, Google Scholar and Pubmed databases. Articles from 1991 to 2022 were selected. The inclusion criteria were articles whose theme was related to the research topic. **Conclusion:** Cryptococcosis is a very serious disease, especially for immunocompromised people, so it is very important to seek new perspectives for treatment. Currently, some research is being carried out with the aim of discovering new drugs for the treatment of cryptococcosis. However, the number of studies aimed at this objective is not many and some of them are not exclusive to cryptococcosis. In addition, one of the main strategies is to take advantage of already known drugs for the treatment of cryptococcosis instead of focusing only on the discovery of new compounds.

Keywords: 1. *Cryptococcus neoformans*; 2.resistance to antifungals; 3.therapeutic targets; 4.cryptococcosis.

Contato: francisca.cavalcante@souicesp.com.br, tulio.ferreira@icesp.edu.br

Introdução

A criptococose é uma infecção fúngica grave causada pelas leveduras *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, que acomete tanto seres humanos como animais silvestres e domésticos (QUEIROZ, 2008). O *C. neoformans* começou a ser descrito na literatura científica nos anos de 1894 e 1895, quando foi isolado em uma infecção óssea de um organismo humano e suco de pêssego (DINIZ-LIMA *et al.*, 2022; ZHAO; LIN, 2021). Esse patógeno fúngico pode ser encontrado no meio ambiente de forma onipresente (MUSELIUS; DURAND; GEDDES-MCALISTER, 2021).

O ciclo de infecção se inicia por meio da via respiratória em decorrência da inalação dos propágulos do *Cryptococcus spp*, que está relacionado a fontes ambientais como, por exemplo: madeira em decomposição, excretas de aves principalmente de pombos, folhas, ar, solos e

flores (OLIVEIRA, 2021).

A maioria dos casos de criptococose é a partir do surgimento da infecção em três etapas: a infecção primária na infância e controle imunológico, seguida de uma fase silenciosa de latência, que pode durar anos; depois ocorre a reativação e disseminação, que ocasiona os sintomas da infecção (ALANIO *et al.*, 2020). A resposta do sistema imune pulmonar é bastante específica e eficaz em eliminar o *Cryptococcus spp*, porém, em pacientes que são imunossuprimidos, acontece a replicação e disseminação do patógeno pelo organismo (ZARAGOZA, 2019). Aproximadamente 15% dos óbitos relacionados a AIDS é devido à meningoencefalite criptocócica, que é a manifestação clínica mais comum da criptococose sistêmica (ZHAO; LIN, 2021).

Outros pacientes imunocomprometidos que estão propensos a criptococose cerebral são

indivíduos com câncer, que fizeram transplante de órgãos e células troncos, que estão utilizando corticosteróides, medicamentos para tratar artrite reumatóide e qualquer medicamento que cause supressão ao sistema imunológico (WOO; MARTINEZ, 2021).

O gênero de *Cryptococcus* possui fatores de virulência caracterizado por serem complexos e heterogêneos, e existe o consenso de que eles são elementos do patógeno que podem provocar danos ao hospedeiro. O *C. neoformans*. Nesse sentido, tem um mecanismo de produção de enzimas degradativas, como exemplo as proteases e lipases como fatores de virulência. Além disso, existem outros fatores de virulência que interferem no sistema imunológico do indivíduo infectado, que são as cápsulas e a melanina (ZARAGOZA, 2019).

O *Cryptococcus spp* possui uma cápsula polissacarídica e uma camada de melanina que possuem, juntas, funções de proteger esse patógeno contra o processo de fagocitose das células de defesa do sistema do hospedeiro, proteção contra lesões oxidativas geradas pelas células fagocitárias, proteção contra substâncias antifúngicas, entre outras funções (PEDRO *et al.*, 2017; CASADEVALL *et al.*, 2019).

O tratamento da criptococose é iniciado com uma terapia denominada “terapia de ataque”, que pode durar algumas semanas. Essa terapia de ataque é nomeada como padrão ouro que consiste na administração de anfotericina B e 5-fluocitosina. Porém, no Brasil, a fluocitosina não é comercializada. Depois desse período de ataque, é utilizado um fármaco da classe dos azóis, que é geralmente o fluconazol (GULLO, 2016).

O *Cryptococcus spp* representou um grande desafio por um tempo para os cientistas micologistas devido a sua estrutura genética e biológica. Com as abordagens utilizadas, foi possível ter uma compressão do *Cryptococcus spp* e fazer a identificação de genes essenciais reguladores de resposta ao estresse e fatores de virulência que podem se tornar alvos terapêuticos para o tratamento da infecção (IYER *et al.*, 2021).

O objetivo deste trabalho é descrever os fatores básicos de virulências presentes no *Cryptococcus spp* e abordar os principais desafios no tratamento da criptococose.

Metodologia

Esta pesquisa é uma revisão bibliográfica, e para sua execução, teve como suporte as bases de dados SciELO, Google Acadêmico e Pubmed. Foram utilizados os seguintes descritores:

Cryptococcus neoformans; resistência aos antifúngicos; alvos terapêuticos; criptococose. Foram selecionados artigos de 1991 a 2022. Os critérios de inclusão foram artigos cuja temática fosse referente ao tema da pesquisa. Como critério de exclusão, artigos que não se enquadrassem ao tema proposto.

Referencial teórico

Criptococose

As infecções fúngicas invasivas são transmitidas pelo ar para várias pessoas pertencentes a grupos de riscos, como, por exemplo, as que sofrem de imunodeficiências, e é um problema crescente para a medicina moderna. Devido ao curso agudo e rápido das infecções invasivas, a prevenção é de suma importância. Tais medidas de prevenção dizem respeito principalmente a métodos de controle de esporos de fungos filamentosos e leveduras no ar. Nesse contexto, o ambiente imediato que oferece nichos ecológicos para crescimento e morfogênese de partículas infecciosas de fungos, tais como *Aspergillus spp.*, *Mucoraceae*, *C. neoformans* e alguns outros fungos leveduriformes, é de grande interesse (STAIB, 1992).

A criptococose tem assumido um papel significativo entre as infecções fúngicas oportunistas por ser uma das micoses mais prevalentes entre indivíduos imunocomprometidos. Seus agentes etiológicos, *C. neoformans* e *C. gattii*, são frequentemente encontrados na natureza em fezes de pombos e de outras aves, bem como na madeira em decomposição, mas também podem sobreviver saprofiticamente no organismo do homem. Embora existam cerca de 34 espécies diferentes do gênero *Cryptococcus*, *C. neoformans* e *C. gattii*, são as únicas conhecidas por causar a criptococose em seres humanos (PEREIRA, BARROS, 2012).

A taxonomia molecular de espécies de *Cryptococcus spp* é uma área que tem evoluído muito, o que permitiu uma maior compreensão das características específicas de cepas, dentre elas aptidão e predileção por certos nichos ambientais. Historicamente, o gênero *Cryptococcus* foi inicialmente classificado em 3 variedades, 5 sorotipos distintos, baseados nas diferenças estruturais das cápsulas, e 8 subtipos moleculares (HAGEN *et al.*, 2015).

Com os avanços das técnicas moleculares de identificação genotípica, foi possível mostrar de forma mais detalhada e significativa a diversidade genética entre o complexo *C. gattii/C. neoformans*, modificando até então, esse sistema de classificação de apenas 2 espécies. Atualmente, utiliza-se as seguintes divisões: *C. neoformans*

var. grubii (sorotipo A) com 3 genótipos (VNI, VNII, VNB); *C. neoformans var. neoformans* (sorotipo D ou VNIV); e 5 outras espécies crípticas, *C. gattii*, *C. bacillisporus*, *C. deuterogattii*, *C. tetragattii* e *C. decagattii* (sorotipos B/C ou VGI-IV), como mostrado no Quadro 1 (HAGEN *et al.*, 2015).

Quadro 1. Classificação atual de espécies de *Cryptococcus* spp. patogênicas

Sorotipo	Espécie e variantes	Tipos moleculares
A	<i>C. neoformans var. grubii</i>	VNI, VNII e VNB
B	<i>C. gattii</i>	VGI, VGII, VGIII, VGIV
C	<i>C. gattii</i>	VGIII, VGIV
D	<i>C. neoformans var. neoformans</i>	VNIV
AD	<i>C. neoformans</i>	VNIII

Fonte: Adaptado de Hagen *et al.* (2015).

No entanto, avanços nas análises filogenéticas, combinadas com a heterogeneidade reconhecida em relação à virulência, preferência de hospedeiro e suscetibilidade a antifúngico, fornecem evidências para sustentar uma nova classificação taxonômica composta por 7 espécies e 4 espécies híbridas, conforme mostra no Quadro 2, a seguir.

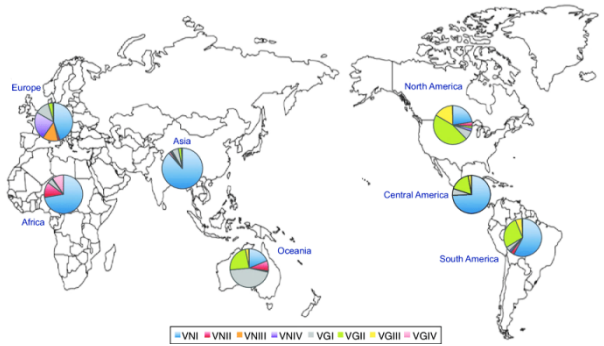
Quando 2. Alterações de taxonomia proposta para o complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*

Nome da espécie atual	Genótipo por RFLP	Nome da Espécie Proposta
<i>C. neoformans var. grubii</i>	VNI VNII VNIII	<i>C. neoformans</i>
<i>C. neoformans var. neoformans</i>	VNIV	<i>C. deneoformans</i>
<i>C. neoformans</i> híbrido de variedade	VNIII	<i>C. neoformans</i> × <i>C. deneoformans</i> híbrido
<i>C. gattii</i>	VGI VGIII VGII VGIV VGIV/VGIIIc	<i>C. gattii</i> <i>C. bacillisporus</i> <i>C. deuterogattii</i> <i>C. tetragattii</i> <i>C. decagattii</i>
<i>C. neoformans var. neoformans</i> × <i>C. gattii</i> AFLP4/VGI híbrido	—	<i>C. deneoformans</i> × <i>C. gattii</i> híbrido
<i>C. neoformans var. grubii</i> × <i>C. gattii</i> AFLP4/VGI híbrido	—	<i>C. neoformans</i> × <i>C. gattii</i> híbrido
<i>C. neoformans var. grubii</i> × <i>C. gattii</i> AFLP6/VGII híbrido	—	<i>C. deneoformans</i> × <i>C. deuterogattii</i> híbrido

Fonte: Hagen *et al.* (2015).

Cerca de 95% das infecções por *Cryptococcus* são causadas por cepas de *C. neoformans* (sorotipo A) com os restantes 4% a 5% das infecções causadas por *C. neoformans* (sorotipo D) ou *C. gattii* (sorotipos B/C). *C. neoformans var. grubii* (sorotipo A) é encontrado em todo o mundo, *C. neoformans var. neoformans* (sorotipo D) está presente principalmente em países europeus e *C. gattii* é historicamente restrito geograficamente a regiões tropicais e subtropicais, como sul da Califórnia, Havaí, Brasil, Austrália, Sudeste Asiático, e África Central. Recentemente, *C. gattii* foi identificado em regiões de clima temperado (Ilha de Vancouver, noroeste do Pacífico dos Estados Unidos e partes da Europa) (Figura 1).

Figura 1 - Distribuição geográfica dos principais tipos moleculares dentro dos complexos de espécies *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*



Fonte: Firacative; Trilles e Meyer (2017).

Esses dados sugerem uma mudança ecológica, que possivelmente esteja relacionada com a mudanças globais de temperatura e umidade (CHEN, MEYER, SORRELL, 2014; HARRIS *et al.*, 2011; PHILLIPS *et al.*, 2015). Embora surtos de criptococose estejam em andamento entre populações imunocomprometidas em todo o mundo, até o momento apenas cepas de *C. gattii* foram relatadas as responsáveis de um surto de doença geograficamente definido, como o ocorrido na ilha de Vancouver, em 2001, tanto em animais como em seres humanos (KIDD *et al.*, 2004).

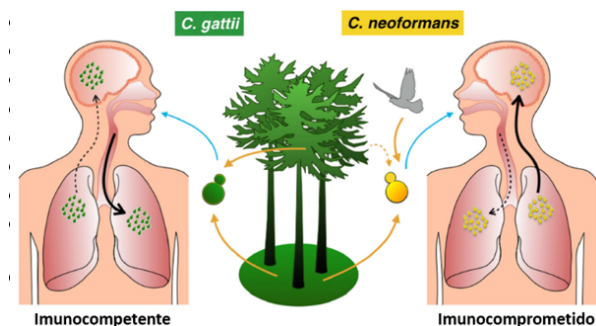
A espécie *C. neoformans* é cosmopolita, onde o seu principal ambiente são as fezes de pombos e outras aves. Ao passo que as espécies de *C. gattii* é endêmico em regiões subtropicais e semitropicais (PEREIRA; BARROS, 2012). Enquanto *C. gattii* está associado à prevalência em indivíduos imunocompetentes, *C. neoformans* está relacionado a indivíduos imunocomprometidos, principalmente aqueles com Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Esses são os principais grupos de risco para a infecção e desenvolvimento de criptococose (ALMEIDA; MACHADO, 2014).

Ciclo de infecção de *Cryptococcus spp*

A infecção geralmente ocorre por meio das vias aéreas e é causada pela inalação do fungo que se aloja principalmente nos pulmões (Figura 2) (ARAÚJO JÚNIOR *et al.*, 2015) A maioria dos que se infectam com o *C. gattii* são indivíduos saudáveis, enquanto *C. neoformans* afeta principalmente aqueles pacientes imunocomprometidos portadores de HIV/AIDS (SILVA, 2022). Os principais alvos da infecção por criptococose são os pulmões e o sistema nervoso central (SANTOS; FIGUEIREDO, 2021). De acordo com alguns estudos, as infecções provocadas por *C. gattii* geralmente evoluem para uma doença pulmonar grave, mas infecções por

C. neoformans têm preferência pelo sistema nervoso central (SNC), causando meningoencefalite e meningites (ANTON, 2021).

Figura 2 - Esquema do Processo de Infecção *C. gatti* (esquerda) versus *C. neoformans* (direita)



Fonte: Adaptada de Bielska e May (2016).

Tratamento para Criptococose

As diretrizes para o tratamento da criptococose foi publicado em 2010 pela Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (*Infectious Diseases Society of America/IDSA*). O tratamento da infecção da criptococose depende da gravidade dos sintomas apresentados e da localidade da infecção (MADA, 2022). Para isso, são utilizados alguns antifúngicos, tais como o fluconazol, a anfotericina B e a 5-flucitosina (QUEIROZ, 2012).

No tratamento de criptococose que não é pulmonar e não meníngea, é recomendado a utilização de fluconazol. O tratamento antifúngico é compreendido em algumas fases que seriam fase da indução, consolidação e manutenção, sendo que a anfotericina B e a 5-flucitosina são para um período de duas semanas e são utilizadas na fase de indução. O fluconazol é para um período de oito semanas e é usado na fase de consolidação (MADA, 2022).

A fase da indução tem objetivo de reduzir a maior quantidade possível de patógenos num prazo de pelo menos duas semanas. Já na fase de consolidação consiste em manter a carga fúngica baixa, para que seja comprovado, por meios de exames laboratoriais em um período de oito semanas, uma negatificação da carga fúngica conforme parâmetros clínicos. A fase de manutenção ou supressão depende do estado imunológico do paciente e o período disso pode ser no prazo de um ano (PASA, 2011).

Outro fator a se considerar é que o tratamento pode variar dependendo dos diversos grupos de riscos, tais como: pacientes infectados pelo HIV, receptores de transplante de órgãos, pacientes não infectados pelo HIV e não

transplantados (IYER et al., 2021). A resistência aos antimicrobianos é uma preocupação crescente para a criptococose e outras doenças infecciosas, dificultando o tratamento. É um fator que colabora para aumentar a dificuldade do tratamento da criptococose e sua resistência natural às equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina), que são lipopeptídeos solúveis em água que inibem a síntese de glicana presente na parede celular de fungos (MACHADO, 2022).

Fatores de Virulência

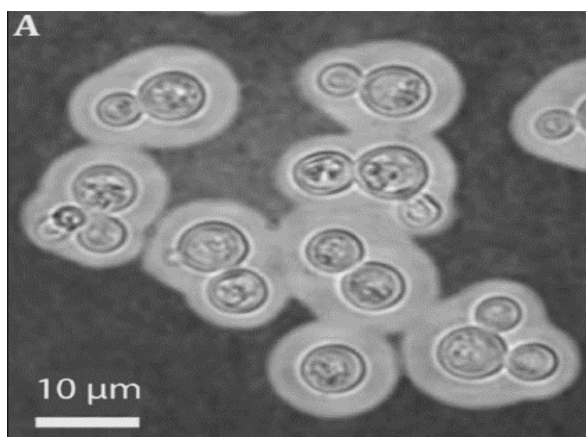
A capacidade de o sistema imunológico do hospedeiro reconhecer a presença de células estranhas no corpo é fundamental para desencadear uma resposta imunoprotetora. Da mesma forma que o sistema imunológico possui estratégias para reconhecer e proteger o indivíduo da colonização desses agentes, os patógenos possuem mecanismos para fugir dessas estratégias e se estabelecer no organismo, além de outros fatores que podem causar danos ao hospedeiro. Numerosos fatores de virulência de *C. neoformans* influenciam a gravidade de uma infecção. No entanto, os três que mais se destacam são: a produção de cápsulas, capacidade de crescimento a 37°C e síntese de melanina (FRAZÃO, 2018).

Produção de Cápsula

A cápsula das espécies de *Cryptococcus spp.* (Figura 3) tem sido extensivamente estudada e é o principal fator de virulência das espécies de *Cryptococcus spp.* O aspecto mais característico do *C. neoformans* é uma cápsula polissacarídica que envolve o corpo celular. A cápsula não é visível à microscopia regular porque é altamente hidrofílica, e devido ao seu alto teor de água (99% do peso total da cápsula), tem o mesmo índice de refração do meio. No entanto, pode ser facilmente visível por várias técnicas (MAXSON et al., 2007). A imagem clássica da cápsula é a de um halo que circunda a célula tornada visível pela suspensão da levedura em preparações de tinta nanquim (Figura 4) (ZARAGOZA et al., 2010).

O efeito de halo é consequência de o fato da cápsula não manchar com nanquim, visível apenas por uma área translúcida. Essa estrutura também pode ser observada por outras técnicas de microscopia, como microscopia eletrônica de varredura e de fluorescência (MAXSON et al., 2007).

Figura 3 – Microscopia ótica de *C. neoformans* evidenciando a cápsula criptocócica após coloração com nanquim. A barra indica uma escala de 10 µm. Ampliação da objetiva de 100X e aumento da ocular de 10X (aumento total de 1000X)



Fonte: Adaptado de Zaragoza *et al.* (2010).

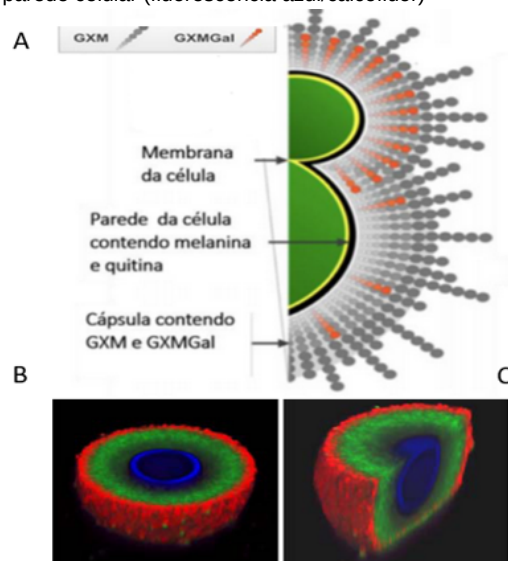
Os polissacarídeos que constituem a cápsula são encontrados em dois pontos diferentes. O primeiro local está ligado à parede celular, formando a estrutura física definida como a cápsula. Em seguida, esses polissacarídeos também são liberados constitutivamente pela célula para o meio ambiente circundante, os quais podem ser isolados como exopolissacarídeos após certos protocolos de purificação em laboratórios. Não se sabe se a liberação da cápsula no meio é um fenômeno ativo regulado pela célula, ou se é apenas um desprendimento inespecífico de cápsulas (NOSANCHUK; CASADEVALL, 1997; ZARAGOZA *et al.*, 2010).

É uma estrutura bastante complexa que reveste a levedura, e no meio ambiente, ela desempenha um papel importante na proteção contra o estresse hídrico e oxidativo. No hospedeiro, ela desempenha um papel importante na virulência fúngica, como evidenciado por experimentos em infecção de murinos infectados com mutantes acapsulados, que foram significativamente menos virulentos quando comparados a linhagens selvagens. Como resultado, é possível concluir que a cápsula desempenha um papel importante na virulência desse patógeno. No entanto, alguns estudos mostraram que certos mutantes acapsulares ou hipocapsulares são capazes de causar danos em organismos gravemente imunocomprometidos ou sob certas condições (FRAZÃO, 2018).

Os principais polissacarídeos encontrados em *C. neoformans* são o glucxilomannano/GXM e o glucoronogalactoxilomannano/GXMGal (BIELSKA e MAY, 2016) (Figura 4). GXM é aproximadamente 90% da massa da cápsula, enquanto GXMGal representa 5%. Além desses dois componentes, a cápsula contém manoproteínas (MP), que representam 1% do seu peso total (MUNIZ, 2015).

Figura 4 – Estrutura da superfície do *C. neoformans*. A) Organização e composição da cápsula. (B/C) Vista em

reconstrução 3D de diferentes seções de células tratadas por imunofluorescência usando anticorpos monoclonais específicos para a cápsula (fluorescência verde/floureceína e vermelha/rodamina) mostrando também a localização da parede celular (fluorescência azul/calcofluor)



Fonte: Adaptada de Bielska e May (2016).

Enquanto o GXM está amplamente distribuído por toda a cápsula, o GXMGal em células acapsulares é encontrado na membrana celular fúngica e nas células capsuladas em regiões discretas mais próximas à superfície da cápsula (FRAZÃO, 2018). Entre as funções do GXM, está a inibição da migração das células de defesa do hospedeiro, dentre elas os neutrófilos. Além disso, em conjunto, o GXM e o GXMGal causarão alterações na produção de citocinas e são responsáveis por induzir a apoptose células apresentadoras de antígenos, como os macrófagos e linfócitos T (PERICOLINI *et al.*, 2006; VILLENA *et al.*, 2008).

Uma das características da cápsula é que após causar infecção nos tecidos pulmonares, ela aumenta de tamanho. O tamanho e a estrutura da cápsula correspondem ao seu ambiente extracelular, por exemplo, as capsulas isoladas do tecido cerebral são menores do que a do tecido pulmonar (CASADEVALL *et al.*, 2019).

A implantação da cápsula também pode ser realizada *in vitro*. Littman (ZARAGOZA, 2009) descreveu métodos para aumentar o tamanho de uma cápsula *in vitro* no final da década de 1950. Desde então, vários estudos mostraram vários fatores críticos para aumentar o tamanho de uma cápsula, como a presença de CO₂, soro de mamífero, concentração de ferro, pH, e outros fatores físicos.

Crescimento a 37°C

Um dos mecanismos de imunidade inata de hospedeiros mamíferos é a alta temperatura corporal. Por causa da temperatura de 37°C, certos microrganismos que podem causar danos a esses hospedeiros não conseguem se estabelecer ou causar doenças (ABBAS *et al.*, 2015). Devido a isso, a capacidade de crescer a 37°C é um dos fatores de virulência para patógenos humanos responsáveis por infecções sistêmicas.

Além de poder crescer em temperatura ambiente, as espécies de *Cryptococcus spp* também podem se estabelecer a 37°C. Como resultado, o número de sítios em que o fungo pode sobreviver cresce. O fungo pode crescer bem no ambiente, como nas fezes de alguns pássaros e nos restos de plantas em decomposição, bem como em mamíferos como humanos, ratos e gatos (KRAUS *et al.*, 2004; BUCHANAN e MURPHY, 1998).

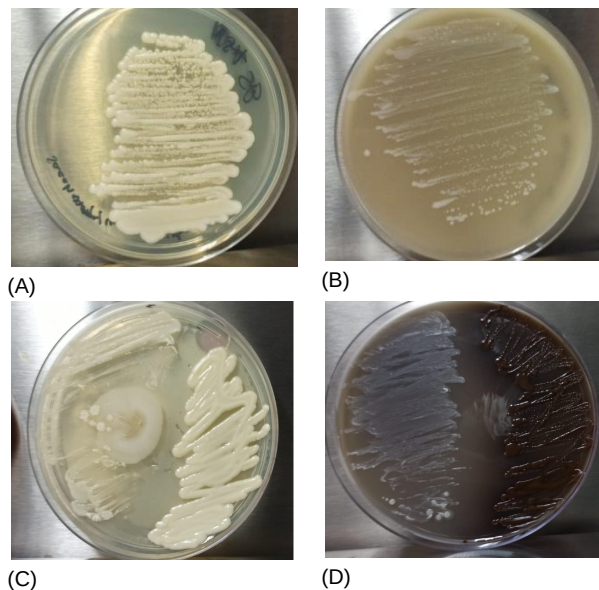
Síntese de melanina

A capacidade de *C. neoformans* produzir pigmentos foi descoberta por Staib no início da década de 1960, quando ele observou que as colônias cultivadas meio ágar, tendo como base semente de pássaro (*Niger seed*), ficavam marrons (POLACHEK, 1991). Essa propriedade tem sido utilizada na identificação de *C. neoformans* por laboratórios de microbiologia de diagnóstico. Quando cultivadas na presença de certos compostos o-difenólicos, como a 3,4-dihidroxifenilalanina (L-dopa), as células de *C. neoformans* apresentam coloração escuras, diferentemente de outras leveduras, como a *Saccharomyces cerevisiae*, conhecida como levedura de pão (não patogênica), que não produz melanina e *Candida albicans*. Essa, embora produza melanina, não é induzida no meio anteriormente mencionado (Figura 5). Esse pigmento escuro foi identificado como sendo a melanina (CASADEVALL; ROSAS; NOSANCHUK, 2000).

Lacase, uma enzima fenol oxidase, usa compostos precursores, incluindo L- e D- dopa, dopamina, epinefrina e norepinefrina para sintetizar melanina. Dois genes da lacase são encontrados em *C. neoformans*, LAC1 e LAC2, ambos responsáveis pela síntese da melanina, sendo o primeiro o principal, e com um nível muito mais alto de transcrição basal (SANTOS, 2017). Somente na presença de substratos exógenos, como a L-DOPA, *C. neoformans*, sintetiza melanina (MUNIZ, 2015).

Figura 5. Análise de síntese de melanina em diferentes espécies de leveduras. (A): *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em meio Sabouraud-ágar; (B) *S. cerevisiae* cultivada

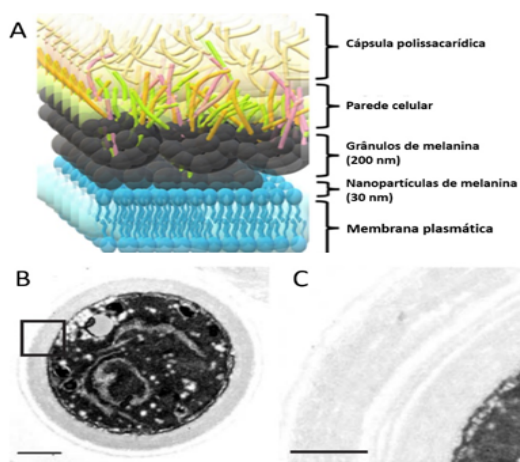
em meio *Niger-seed*-ágar; (C): *Candida albicans* (esquerda) e *C. neoformans* (direita) cultivadas em meio Sabouraud-ágar; (D) *Candida albicans* (esquerda) e *C. neoformans* (direita) cultivadas em meio *Niger-seed*-ágar



Fonte: Próprios autores (2022). Dados não publicados.

A melanina é uma partícula pigmentada de cor escura, marrom ou preta, encontrada na parede celular do fungo. O processo de melanização em *C. neoformans* é resultado da deposição do polímero na parte mais interna da superfície da parede celular (Figura 6). A melanina é um pigmento composto de partículas esféricas compactas que variam de 40 a 130 nm de diâmetro, e que se encontram dispostas em camadas concêntricas na parede celular. Os grânulos de melanina estão ancorados à quitina, quitosana e-glucana, componentes da parede celular subjacentes a cápsula polissacarídica de *C. neoformans* (EISENMAN; CASADEVALL, 2012).

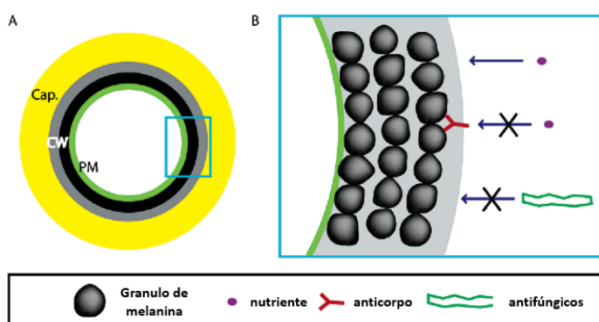
Figura 6 – Estrutura da superfície de *C. neoformans*. (A) Modelo apresentando a arquitetura da membrana plasmática composta por uma bicamada lipídica, que interage com as nanopartículas de melanina que se agregam para formar os grânulos de melanina maiores. (B) Microscopia eletrônica de transmissão de uma célula melanótica de *C. neoformans* mostrando a estrutura do anel concêntrico (B) da camada de melanina em detalhe. Barra de escala, 500 nm, (Ampliação X 10.000)



Fonte. Adaptado de Camacho *et al.* (2019) e Mandal *et al.* (2007).

A melanina trabalha para proteger a célula fúngica do estresse oxidativo e da fagocitose. Também pode modificar a resposta imune do hospedeiro, fornecer mais proteção para a parede celular, e tornar a célula fúngica mais resistente a antifúngicos como a anfotericina B (SANTOS, 2017). De acordo com alguns estudos, pequenas moléculas de nutrientes, como açúcares e aminoácidos, podem entrar na célula, passando por meio de espaços presentes entre os grânulos de melanina. Além disso, o tamanho grande de certos medicamentos antifúngicos pode impedir sua passagem pelos espaços apertados entre os grânulos de melanina. A ligação de anticorpos à melanina pode impedir a passagem de nutrientes, bloqueando esses espaços (Figura 7B). Portanto, o bloqueio da entrada de nutrientes leva a um processo de privação nutricional da levedura, inibindo o seu crescimento (EISENMAN *et al.*, 2005). Esse mecanismo implicaria em uma alternativa para tratamento contra infecções criptocócica (Figura 7).

Figure 7 - Modelo da estrutura da melanina em *C. neoformans*. Cap (capsula), CW (parede celular), PM (membrana plasmática). Camada de melanina em preto (A). Permeabilidade de diferentes compostos pela camada de melanina (B)



Fonte: Adaptado de Eisenman *et al.* (2005)

A melanina é insolúvel em solventes orgânicos e aquosos e, por isso, são difíceis de serem estudadas por técnicas bioquímicas e biofísicas convencionais. Isso torna o conhecimento sobre os mecanismos de proteção do *Cryptococcus spp* pela melanina muito complexo (CASADEVALL; ROSAS; NOSANCHUK, 2000).

Plasticidade genômica

A plasticidade genômica se refere à característica do gene de ter uma alta capacidade e flexibilidade de mudança, que consiste em modificação de sua arquitetura genômica. Segundo Iyer *et al.* (2021), a plasticidade, juntamente com adaptabilidade fisiológica, confere uma resistência aos antifúngicos utilizados, e é possível encontrar esse fenômeno nas espécies de *Cryptococcus spp*. Esse processo de modificação da estrutura dos genes é devido à heterorresistência, a qual pode ser conceituada como subpopulações de microrganismos que têm uma resistência a certos antibióticos, ao mesmo tempo em que existirão populações que não são resistentes (LUZ, 2014). Ela é desenvolvida a partir da constituição tanto *in vitro* como *in vivo* de células, que são aneuploides, e associada a ocorrência de dissomia do cromossomo 1, que incluem o ERG11 e o gene principal na bomba de efluxo AFR1 (IYER *et al.*, 2021).

É possível concluir que a plasticidade genômica confere aos patógenos fúngicos a capacidade de adaptação ao meio externo e o desenvolvimento da resistência (LEE, 2020).

Alterações morfológicas

Alterações morfológicas são modificações na estrutura da célula ou tecido. No caso da *Cryptococcus spp*, ocorrem mudanças na cápsula e parede celular, que são essenciais para o desenvolvimento de resistência e influencia a virulência (IYER *et al.*, 2021). A virulência do *C. neoformans* está associada a células titãs, que também são associadas com os mecanismos de alterações estruturais. Esses consistem, por exemplo, no aumento do tamanho da célula e nas transformações na parede celular e na cápsula que são responsáveis por alterar a resposta do sistema imune do hospedeiro (ZAFAR, 2019).

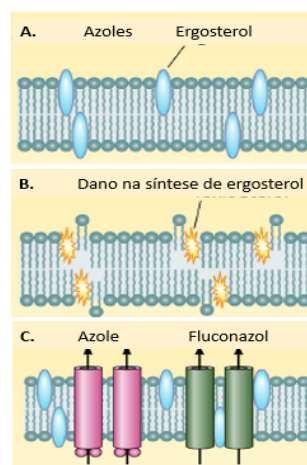
Resistência a antifúngicos

O tratamento da criptococose, na maior parte das vezes, depende dos antifúngicos da classe dos azóis, cujo alvo é a enzima Erg11, que é a responsável pela síntese de ergosterol presente na membrana plasmática do *C. neoformans* (Figura A). Quando ocorre a inibição da síntese de ergosterol, a membrana sofre um

estresse, o que acarreta a morte do *C. neoformans* (Figura 8B). O desenvolvimento dessa resistência aos azóis em *C. neoformans* é considerado um evento raro em nível mundial, pois um estudo com 1.811 isolados clínicos obtidos entre 1990 e 2004 mostrou ser incomum (PFALLER *et al.*, 2005). Apesar dessa raridade, cerca de 80 isolados resistentes a azóis foram detectados do líquido cefalorraquidiano de pacientes com quadro de meningite criptocócica no Quênia. No total, 11,2% dessas cepas se mostraram ser resistentes ao fluconazol, enquanto 65% foram suscetíveis, mas dependentes da dose (BII *et al.*, 2007). Além disso, o surgimento de resistência a azóis tem sido documentado para pacientes com AIDS submetidos a longo prazo a terapia com fluconazol (ARMENGOU *et al.*, 1996). Estudos epidemiológicos recentes observaram que isolados coletados de diferentes regiões geográficas têm suscetibilidades alteradas ao fluconazol, como a resistência documentada entre isolados da Ásia-Pacífico, África/Oriente Médio e regiões da América Latina, mas não entre isolados provenientes da Europa ou América do Norte (PFALLER *et al.*, 2009).

Semelhante ao caso de *C. albicans*, um mecanismo de resistência a drogas bastante eficaz em *C. neoformans* é a superexpressão de transportadores de multidrogas. Esse mecanismo leva a uma diminuição do acúmulo dos azólicos na região intracelular, fazendo que essa levedura escape da ação antifúngica (Figura 8C). O transportador de drogas mais bem caracterizado em *C. neoformans* é o transportador ABC AFR1. Uma constatação que foi feita partiu de ensaios clínicos onde mutantes resistentes ao fluconazol foram gerados *in vitro* por meio da exposição de um isolado clínico inicialmente sensível ao fluconazol. Observou-se que posteriormente ao tratamento contínuo dessa cepa, que houve uma superexpressão do gene que codifica AFR1 tornando-a resistente (POSTERARO *et al.*, 2003).

Figura 8 - Mecanismos de ação de antifúngicos da classe dos azóis na membrana de *C. neoformans* e resistência.

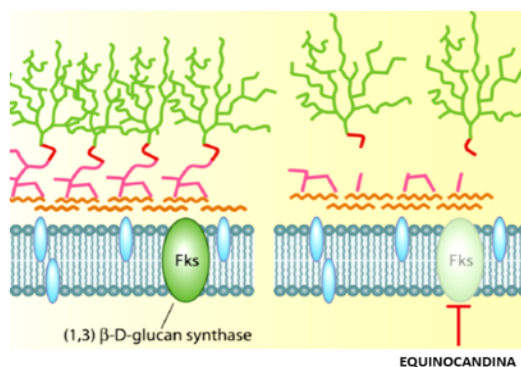


Fonte: Adaptado de Shapiro, Robbins e Leah (2011).

Uma outra dificuldade no tratamento da criptocose é a resistência própria do patógeno, as equinocandinas. As equinocandinas pertencem à classe de medicamentos canidinas, que atuam inibindo a enzima 1,3-beta glucano sintase (Figura 9), responsável pela formação de polímeros 1,3-beta-glucano, que compõe a parede dos fungos. A ruptura desse polissacarídeo resulta na perda da integridade da parede celular e estresse severo da parede celular na célula. O *Cryptococcus spp.* é resistente às classes das equinocandinas. Uma das teorias seria que essa resistência pode ser pelo alto efluxo da célula e devido também à degradação do fármaco no meio intracelular e extracelular (CUENCA-ESTRELLA, 2010; SHAPIRO, ROBBINS; LEAH, 2011).

As equinocandinas têm uma característica singular pela sua atuação na parede celular, sendo que essa estrutura não faz parte das células animais, e, por isso, são menos propensas a ocorrência de eventos tóxicos (BADER, 2018).

Figura 9 - Mecanismo de ação da equinocandina



Fonte: Adaptado de Shapiro, Robbins e Leah (2011).

Alvo terapêutico

Genes essenciais

Por muitos anos, o objetivo de pesquisas

científicas abrange a identificação de genes essenciais em espécies de fungos que possam ser usados como alvos terapêuticos (IYER *et al.*, 2021). Em um estudo realizado por Aniri e Idnurm (2015), foram identificados 32 genes que compõem uma lista de genes que não fazem parte do organismo humano, mas são presentes nos fungos que incluem o TRR1, FOL1, MGM101, FAS1, FAS2, HOM3, THR1 e IPC1. Esses achados podem conduzir a estudos mais aprofundados no desenvolvimento de substâncias ou métodos de inibição da expressão, visto que esses genes mostraram ser essenciais para o desenvolvimento do *C. neoformans*.

Respostas ao estresse

Para sobrevivência de organismos fúngicos frente às mudanças ambientais é essencial o mecanismo de resposta ao estresse. O *C. neoformans*, por exemplo, é capaz de crescer em determinadas situações de estresse, como na escassez de nutrientes, em temperatura de 37°C e diante do estresse nitrosativo e oxidativo (GOULART, 2009).

Outro exemplo sobre resposta ao estresse que colabora para resistência e virulência é a proteína fosfatase calcineurina. Essa é responsável pela resistência e virulência em fungos patógenos, pois direciona as respostas do fungo ao estresse e permite que ele sobreviva a essas mudanças ambientais. A maioria dos inibidores de calcineurina que existe atualmente compreende imunossupressores, porém, é necessário que os inibidores sejam seletivos para fungos (IYER *et al.*, 2021).

Novas drogas

A descoberta de novas drogas antifúngicas é bastante desafiadora, pois a maioria dos compostos desenvolvidos foi criada para potencializar suas propriedades em relação ao organismo de mamíferos. Em contrapartida, as drogas para fungos requerem propriedades específicas principalmente devido a necessidade de atravessar sua parede celular (IYER *et al.*, 2021).

Um estudo em 2018 relata a existência de 11 compostos que seriam promissores para se utilizar no tratamento da criptococose, porém, a conclusão do artigo é que muitos desses compostos não são exclusivos para o tratamento da criptococose, e que embora alguns estudos tenham identificado novos compostos, a maioria desses ensaios consiste no reaproveitamento de drogas que também podem atuar como agentes

antifúngicos (SANTOS-GANDELMAN; RODRIGUES; MACHADO SILVA, 2018).

Dentre as alternativas está a inibição da enzima lacase. Como descrito anteriormente, a síntese de melanina é dependente da enzima lacase e uma vez que o hospedeiro mamífero não possui essa enzima, ela se torna um alvo candidato bastante atrativo para o estudo da patogênese fúngica, bem como um alvo de drogas (EISENMAN *et al.*, 2005, ZIMBRES *et al.*, 2019).

Conclusão

A criptococose é uma doença grave, principalmente para pessoas imunocomprometidas.

Os fatores de virulência do *Cryptococcus* são essenciais para conseguir infectar o hospedeiro, que consiste na produção da capsula, síntese de melanina e o crescimento 37°C. A partir desses mecanismos é possível compreender como funciona o processo de infecção do *Cryptococcus*.

Outro fator importante é a plasticidade genômica que é um mecanismo essencial para desenvolvimento da resistência a antifúngicos. A compreensão desses fatores contribui para a busca de novos tratamentos da criptococose.

Atualmente, estão sendo desenvolvidas algumas pesquisas com o objetivo de descobrir novos fármacos para tratamento da criptococose. Porém, o número de estudos voltado a esse objetivo não é grande e alguns desses não são exclusivos para a criptococose. Além disso, uma das principais estratégias é aproveitar fármacos já conhecidos para o tratamento da criptococose, ao invés de focar somente na descoberta de novos compostos.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado essa oportunidade de concluir uma graduação. Segundo, agradeço a meu orientador professor Túlio, por me auxiliar com todas minhas dúvidas. Agradeço também à minha família, pelo apoio e compreensão nesse momento de conclusão de curso. Por fim, agradeço à minha amiga Fernanda Machado, pelo apoio.

Referências:

- Alanio, A. Dormancy in *Cryptococcus neoformans*: 60 years of accumulating evidence. *The Journal of clinical investigation*. 2020;130(7):3353-3360.
- Almeida RLG, Machado ER. *Cryptococcus* spp. em pacientes com HIV/SIDA: Revisão da Literatura. *Ensaios e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde*. 2014;18(1).
- Anton CL. Caracterização funcional do gene SMF1 de *Cryptococcus gattii*. [Trabalho de Conclusão de Curso]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2021.
- Araújo Júnior ECD, Táparo CV, Uchida CY, Marinho M. *Cryptococcus*: isolamento ambiental e caracterização bioquímica. *Arquivo Brasileiro de Medicina veterinária e zootecnia*. 2015;67:1003-1008.
- Bader JC, Bhavnani SM, Andes DR, Ambrose PG. We can do better: a fresh look at echinocandin dosing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018; 73(1):4450.
- Bielska E, Robin. What Makes *Cryptococcus Gattii* a Pathogen? *FEMS Yeast Research*. 2016;16 1):f106.
- Bii CC, Makimura K, Abe S, Taguchi H, Mugasia OM, Revathi G, Kamiya S. Antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* from clinical sources in Nairobi, Kenya. *Mycoses*. 2007;50(1):25-30.
- Buchanan K, Murphy JW. What Makes *Cryptococcus Neoformans* a Pathogen?" *Emerging Infectious Diseases* 1998;4(1):71–83.
- Casadevall A, Coelho C, Cordero RJ, Dragotakes Q, Jung E, Vij R, Wear MP. The capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Virulence*. 2019;10(1):822-831.
- Casadevall A, Rosas AL, Nosanchuk JD. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Current opinion in microbiology*. 2000;3(4):354-358.
- Chaucanés CPB. Expressão e caracterização enzimática da Tioredoxina redutase (Trr1) e do seu substrato Tioredoxina (Trx1) e identificação de novas drogas por modelagem molecular do alvo Trr1 do fungo patogênico *Cryptococcus neoformans*. [Dissertação]. Universidade de Brasília; 2014.
- Chitolina GZ. Caracterização de mutantes de *Cryptococcus gattii* associados à formação de biofilme. [Dissertação]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2019.
- Criptococose GDC. Consenso em criptococose - 2008. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41(5):524-44.
- Cuenca-Estrella M. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. *Rev Esp Quimioter*. 2010;23(4):169-76.
- Diniz-Lima I, Fonseca LMD, Silva-Junior EBD, Guimarães-de-Oliveira JC, Lima, LF, Nascimento DO, Lima CGF. *Cryptococcus*: History, Epidemiology and Immune Evasion. *Applied Sciences*. 2022;12(14):7086.
- Eisenman HC, Nosanchuk JD, Webber JBW, Emerson RJ, Camesano TA, Casadevall A. Microstructure of cell wall-associated melanin in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Biochemistry*. 2005;44(10):3683-3693.
- Firacative C, Trilles L, Meyer W. Advances in the understanding of the *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* species complexes and cryptococcosis. *Microbiology Australia*. 2017;38(3):106-111.
- Frazão SO. Avaliação da ocorrência de exocitose não-lítica em isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. [Dissertação]. Universidade de Brasília; 2018.
- Goulart LS. Genes diferencialmente expressos por *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* durante a infecção de macrófagos. [Dissertação]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009.

- Gullo FP. Novas alternativas terapêuticas para o tratamento da Criptococose: análogos de Resveratrol e microRNAs. [Dissertação]. Universidade de São Paulo; 2016.
- Ianiri, G, Idnurm A. Essential gene discovery in the basidiomycete *Cryptococcus neoformans* for antifungal drug target prioritization. *MBio*. 2015;6(2):e02334-14.
- Iyer KR, Revie NM, Fu C, Robbins N, Cowen LE. Treatment strategies for cryptococcal infection: challenges, advances and future outlook. *Nature Reviews Microbiology*. 2021;19(7):454-466.
- Kraus PRMJ, Boily SS, Giles JE, Stajich A, Allen GM, Cox FS, Dietrich JRP, Heitman J. Identification of *Cryptococcus Neoformans* TemperatureRegulated Genes with a Genomic-DNA Microarray. *Eukaryotic Cell*. 2004;3(5):1249–60.
- Lee Y, Puumala E, Robbins N, Cowen LE. Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. *Chemical reviews*. 2020;121(6):3390-3411.
- Luz DI. Heterorresistência e resistência adaptativa à Polimixina B em isolados de Enterobacteriaceae produtores de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. KPC; 2014.
- Machado KRG. Influência das condições nutricionais na virulência e resistência antifúngica de *Cryptococcus* spp. *Revista Ceuma Perspectivas*. 2022;37(20):550.
- Mada PK, Jamil RT, Alam MU. *Cryptococcus*. StatPearls: StatPearls Publishing; 2022.
- Mandal P, Roy TS, Das TK, Banerjee U, Xess I, Nosanchuk JD. Differences in the cell wall architecture of melanin lacking and melanin producing *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from India: an electron microscopic study. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2007;38:662-666.
- Mauch RM, Cunha VO, Dias ALT. The copper interference with the melanogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2013;55:117-120
- Muniz ACF. Caracterização do mutante do gene OPI3 de *Cryptococcus neoformans*. [Dissertação]. Universidade de Brasília; 2015.
- Muselius B, Durand SL, Geddes-Mcalister J. Proteomics of *Cryptococcus neoformans*: From the Lab to the Clinic. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(22):12390.
- Oliveira EP. Criptococose: determinação do perfil clínico-demográfico de pacientes com AIDS atendidos em unidades de saúde pública de Pernambuco. [Dissertação]. Universidade Federal de Pernambuco; 2021.
- Pasa CR. Tipagem molecular e suscetibilidade antifúngica de *Cryptococcus* isolados de pacientes em hospital universitário com investigação domiciliar. [Dissertação]. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul; 2011.
- Pedro ICARJ, Gomes P.DSCK, Vivian B, Ramos G. Criptococose: uma mini-revisão. *Cobrasis*; 2017.
- Pedroso RS, Costa KRC, Ferreira JC, Candido RC. Evaluation of melanin production by *Cryptococcus* species in four different culture media. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2007;40(5).
- Pereira TCD, Barros RAM. *Cryptococcus neoformans* E *Cryptococcus gattii*: perspectivas sobre a eco-epidemiologia e novos nichos ecológicos. *Revista Científica*. 2012;1(1).
- Pericolini E, Cenci E, Monari C, Jesus M, Bistoni F, Casadevall A, Vecchiarelli A. *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide component galactoxylomannan induces apoptosis of human T-cells through activation of caspase-8. *Cellular microbiology*. 2006;8(2):267-275.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Bijie H, Dzierzanowska D, Zaidi M. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: 10.5-year analysis of susceptibilities of noncandidal yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *Journal of clinical microbiology*. 2009;47(1):117-123.

- Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Global trends in the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(5):2163-2167.
- Polacheck I. The discovery of melanin production in *Cryptococcus neoformans* and its impact on diagnosis and the study of virulence. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 1991;276(1):120-123.
- Posteraro B, Sanguinetti M, Sanglard D, La Sorda M, Boccia S, Romano L, Fadda G. Identification and characterization of a *Cryptococcus neoformans* ATP binding cassette (ABC) transporter-encoding gene, CnAFR1, involved in the resistance to fluconazole. *Molecular microbiology*. 2013;47(2):357-371.
- Pozio E, Guarino A, Pignata C, Morales MAG. Possible development of resistance to fluconazole during suppressive therapy for AIDS-associated cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis*. 1996;23:1337-1338.
- Queiroz EO. Atividade antifúngica in vitro dos óleos essenciais de *Coriandrum sativum* L. (coentro) e *Foeniculum vulgare* Mill. (funcho) sobre cepas de *Cryptococcus neoformans*. [Dissertação]. Universidade Federal da Paraíba; 2012.
- Queiroz JPAF. Criptococose-uma revisão bibliográfica. *Acta Veterinaria Brasilica*. 2008;2(2):32-38.
- Santos EF, Figueiredo EFG. Criptococose: consequência da infecção por *Cryptococcus neoformans* em pacientes com AIDS no Brasil. *Research, Society and Development*. 2021;10(9):e150101522591-e150101522591.
- Santos TS. Efeito de metabólitos secretados por *Cryptococcus neoformans* na interação com macrófagos murinos. [Dissertação]. Universidade de Brasília; 2017.
- Santos-Gandelman J, Rodrigues ML, Silva, AM. Future perspectives for cryptococcosis treatment. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2018;28(8):625-634.
- Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2011;75(2):213-267.
- Silva CLR. *Cryptococcus* spp. Em unidades básicas de saúde de Campo Grande-MS: Tipagem molecular e susceptibilidade antifúngica. [Dissertação]. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul; 2022.
- Staib F. Pathogenic fungi in human dwellings* Pathogene Pilze im Wohnbereich des Menschen. *Mycoses*. 1992;35(11):289-292.
- Villena SN, Pinheiro RO, Pinheiro CS, Nunes MP, Takiya CM, Reis GA, Freire-de-Lima, CG. Polissacarídeos capsulares galactoxilomanano e glucuronoxilomanano de *Cryptococcus neoformans* induzem apoptose de macrófagos mediada pelo ligante Fas. *Cellular microbiology*. 2008;10(6):1274-1285.
- Woo YH, Martinez LR. *Cryptococcus neoformans*–astrocyte interactions: effect on fungal blood brain barrier disruption, brain invasion, and meningitis progression. *Critical reviews in microbiology*. 2021;47(20):206-223.
- Zafar H, Altamirano S, Ballou ER, Nielsen K. A titanic drug resistance threat in *Cryptococcus neoformans*. *Current opinion in microbiology*. 2019;52:158-164.
- Zaragoza O, Rodrigues ML, Jesus M, Frases S, Dadachova E, Casadevall A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Advances in applied microbiology*. 2009;68:133-216.
- Zaragoza O. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. *Virulence*. 2019;10(10):490-501.
- Zhao Y, Lin X. *Cryptococcus neoformans*: Sex, morphogenesis, and virulence. *Infection, Genetics and Evolution*. 2021;89:104731.
- Zimbres ACG, Reuwsaat JC, Barcellos VA, Joffe LS, Fonseca FL, Staats CC, Rodrigues ML. Pharmacological inhibition of pigmentation in *Cryptococcus*. *FEMS yeast research*. 2019;19(1).