



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA KEIZO-ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CRIPTOCOCOSE E DETERMINAÇÃO DO EFEITO ANTIFÚNGICO IN VITRO E IN VIVO POR SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA COM CICLOPIROX OLAMINA

PATRICIA DE OLIVEIRA KOCERGINSKY

Fevereiro/2013

Recife-PE



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA KEIZO-ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CRIPTOCOCOSE E DETERMINAÇÃO DO EFEITO ANTIFÚNGICO IN VITRO E IN VIVO POR SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA COM CICLOPIROX OLAMINA

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Laboratório de Imunologia Keizo-Asami do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de doutor.

Doutoranda: PATRICIA DE OLIVEIRA KOCERGINSKY

Orientadora: Profa. Dra. NEREIDE STELA SANTOS MAGALHÃES

Co-orientadora: Profa. Dra. REJANE PEREIRA NEVES

Fevereiro/ 2013

Recife – PE

Catálogo na fonte

Elaine Barroso

CRB 1728

Kocerginsky, Patrícia de Oliveira

Criptococose e determinação do efeito antifúngico *in vitro* e *in vivo* por sistema de liberação controlada com ciclopirox olamina/ Patrícia de Oliveira Kocerginsky– Recife: O Autor, 2013.

139 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Nereide Stela Santos Magalhães

Coorientadora: Rejane Pereira Neves

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Ciências Biológicas, 2013.

Inclui referências e anexos

- 1. Micose 2. Cryptococcus 3. Fungos patogênicos I. Magalhães, Nereide Stela Santos (orientadora) II. Neves, Rejane Pereira (coorientadora) III. Título**

616.969

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-119

**Criptococose e Determinação do efeito antifúngico in vitro e in vivo por
Sistema de Liberação controlada com Ciclopirox Olamina**

Aprovada em: 22 de fevereiro de 2013

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a Dr^a Nereide Stela Santos Magalhães

Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Prof^a Dr^a Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo

Departamento de Micologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto

Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Prof^a Dr^a Mariane Cajuba de Britto Lira

Centro acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

EXAMINADOR INTERNO: Prof^a Dr^a Adriana Fontes

Departamento Biofísica da Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

DEDICO

*Ao meu amado, precioso e único Senhor da minha vida, **Jesus Cristo**, por todo Seu suprimimento, amor, ensinamentos, direção e principalmente por permanecer fiel as suas promessas, até mesmo quando eu sou infiel.*

*Aos meus pais: **Oliveira e Valda**, meus grandes amores.*

OFEREÇO

*Ao meu esposo amado **Sergio Kocerginsky** por tudo que ele me fez enxergar, reconhecer e aprender com sua dedicação, sinceridade e amor.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu Senhor e Salvador Jesus Cristo, autor da minha vida, que me transportou das trevas para o reino do seu filho amado; escolheu-me, amou-me com amor eterno e é o grande responsável por todas as minhas conquistas. A Ele, eu declaro todo o meu amor e toda a minha gratidão para sempre!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Grupo de pesquisa SLC e a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da UFPE nas pessoas da Coordenadora Maria Tereza dos Santos Correia, da secretária Adenilda.

Aos funcionários do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA)

Ao prof. Armando Marsden, chefe do laboratório de Micologia Médica, pelo seu bom-humor, profissionalismo e ética, que fazem dele um biomédico reconhecido, admirado e acima de tudo, respeitado.

Às doutoras Taciana Antunes e Solange Mesquita por terem gentilmente cedido as amostras de LCR para o desenvolvimento da minha pesquisa e em especial, às funcionárias do laboratório Cibeles, Solange, Thayanna e Alcione pelo apoio e simpatia. Muito obrigada meninas!!! Foi um prazer ter conhecido vocês!

A minha orientadora Nereide Stela Santos Magalhães por seu profissionalismo, competência e dedicação à vida acadêmica. Obrigada por ter me recebido tão bem no grupo de pesquisa SLC!

A minha co-orientadora Rejane Pereira Neves pela orientação maravilhosa e por sempre desejar o melhor para mim! Obrigada por tudo!

Às professoras Mariane Lira e Danielle Macêdo por contribuírem com suas experiências e saberes para o aperfeiçoamento de minha tese. Dani, obrigada também por todo apoio, ajuda e incentivo!

Ao professor Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto pela amizade e apoio em minha caminhada acadêmica desde a minha graduação. Parabéns por ser um exemplo de determinação e profissionalismo. Você é o irmão superinteligente que eu não tive e que sempre quis ter! :)

Aos meus amigos da Micologia, em especial a Carol, Suanni, Fabíola e Mariele por todos os momentos bem vividos juntos.

Às minhas amigas Vanessa Karina e Isabella Macário para quem tudo que se diga de bom ainda é pouco. Não tenho palavras para agradecer toda a ajuda e apoio nos momentos mais críticos de minha jornada acadêmica! Agradeço a Deus por ter amigas maravilhosa como vocês! Que a nossa amizade seja eterna!

Aos meus colegas e amigos do SLC, em especial às pessoas Pabyton, Rafaela e Milena. Obrigada pelo apoio, amizade, ensinamentos e horas de descontração também!

*Aos alunos de Iniciação Científica Pedro Soares e Hannah Lyra por terem sido muitas vezes meus braços e meus pés nos “intermináveis” experimentos *in vitro* e *in vivo*.*

Aos meus pais (Oliveira e Valda), meus amores, que sempre me deram o apoio necessário para que eu conseguisse vencer todas as dificuldades.

A todas as pessoas, mais próximas ou distantes, que torceram junto a mim pela conclusão de mais uma etapa da minha vida.

"Combati o bom combate, completei a carreira, guardei a fé" (II Tm 4:7).

RESUMO

A criptococose é uma infecção fúngica predominantemente oportunista cujos principais agentes etiológicos são *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*. O tratamento de escolha para a micose é a anfotericina B associada ou não a 5-fluorocitosina seguido de terapia de manutenção com fluconazol. Contudo, falhas no tratamento associadas à toxicidade e ao aparecimento de resistência aos fármacos têm sido relatadas, o que torna essencial a descoberta de novas alternativas terapêuticas, como a ciclopirox olamina (CPO). Neste contexto, o objetivo deste estudo foi caracterizar e avaliar a ação *in vitro* e *in vivo* da CPO livre e encapsulada em lipossomas frente a amostras de *Cryptococcus neoformans* para futura aplicação no tratamento da criptococose sistêmica. Foram obtidas 30 amostras de *Cryptococcus neoformans* provenientes de pacientes imunocomprometidos. A preparação dos lipossomas convencionais e furtivos de CPO foi realizada pelo método da hidratação do filme lipídico e a caracterização foi realizada avaliando os seguintes parâmetros: tamanho de partícula, Índice de Polidispersão (PDI) e taxa de encapsulação (EE%). Para otimização dos constituintes lipídicos, foi realizado um planejamento fatorial fracionado a 2^{4-1} a partir da melhor formulação obtida nos estudos de pré-formulação. A cinética de liberação *in vitro* foi conduzida para avaliar e comparar estatisticamente o perfil de liberação dos sistemas convencional e furtivo. Adicionalmente, testes de susceptibilidade antifúngica foram realizados de acordo com—*Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Para caracterização molecular dos isolados, PCR fingerprinting foi conduzida utilizando os primers M13 e URA5. O estudo *in vivo* foi conduzido com camundongos imunossuprimidos, infectados com *Cryptococcus neoformans* (10^6 cels/mL) e tratados com CPO lipossomal (Lipo-CPO) (0.5 mg/Kg). As concentrações de CPO utilizadas na forma livre e encapsuladas em lipossomas convencionais e furtivos variaram de 0,30 a 625 µg/mL. Os resultados do planejamento fatorial mostraram que o ponto central apresentou características proeminentes com redução do tamanho de partícula em 17,1%; melhora do PDI em 15,34% e da quantidade de fármaco encapsulado (25%). A cinética do lipossoma furtivo apresentou uma velocidade de liberação mais controlada quando comparada ao lipossoma convencional. Com relação ao teste de susceptibilidade, todos os inóculos foram susceptíveis a CPO livre, com atividade fungistática entre 0,30 e 0,61 µg/mL e fungicida entre 1,22 e 4,88 µg/mL. Não houve diferença relacionada à atividade antifúngica entre as formulações lipossomais convencionais e furtivas. A atividade fungistática dos lipossomas foi observada em concentrações variando de 1,22 e 2,44 µg/mL. A faixa das concentrações fungicidas foi de 1,22 a 9,76 µg/mL. O padrão de bandas do URA5 revelou que todos os isolados apresentam genótipo VNI, característico de *C. neoformans*. Lipo-CPO apresentou eficácia antifúngica comparada à anfotericina B após 14 dias de infecção, reduzindo a carga fúngica em aproximadamente 8% no baço, 41% no fígado, 63% no pulmão e 89% no cérebro. O exame histológico evidenciou infiltrado celular no fígado dos grupos tratados com Lipo-CPO e anfotericina B, porém com menor intensidade quando comparado ao grupo controle. O estudo sugere que a CPO encapsulada em lipossomas apresenta significativa ação antimicótica frente às amostras sistêmicas de *C. neoformans*, reforçando seu potencial na terapêutica da criptococose.

Palavras-chave: Criptococose, ciclopirox olamina lipossomal, cinética de liberação *in vitro*, atividade antifúngica *in vitro*, criptococose experimental.

ABSTRACT

Cryptococcosis is an opportunistic fungal infection whose the main ethiological agents are *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. The treatment of choice for this mycosis is amphotericin B combined or not with 5-fluorocytosine, followed by maintenance therapy with fluconazole. However treatment failures associated with toxicity and drug resistance has been reported, which makes it essential to the discovery of new therapies, such as ciclopirox olamine (CPO). The purpose of this study was to characterize and evaluate the *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of ciclopirox olamine in its free form and encapsulated in liposomes against thirty *Cryptococcus neoformans* isolates obtained from immunocompromised patients for future application in systemic cryptococcosis treatment. Preparation of conventional and stealth liposomes was performed to define particle size, polydispersity index (PDI), CPO amount of encapsulated and efficiency of encapsulation (EE%). For optimization of liposomal lipid constituents, a 2^{4-1} fractional factorial design was carried out from the prominent formulation obtained in pre-characterization studies. *In vitro* release kinetics was conducted to evaluate and compare statistically the release profile of conventional and stealth liposomes. Antifungal susceptibility testing was conducted in accordance with the reference method. Regarding molecular characterization, PCR fingerprinting was carried out by using MT3 and URA5 primers. Concentrations of CPO used in free form and encapsulated into stealth and conventional liposomes ranged from 625 to 0.3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Despite of the central point of the factorial design have increased the total lipids amount in 35.52%, it showed prominent characteristics when compared with the L4 formulation with improvement of the mean size in 17.1%, PDI in 15.34% and CPO amount in 25%. The minimum concentrations of stearylamine to obtain the stable formulation for one month was 5.88 mM. . Kinetics of stealth liposomes showed a release profile more controlled as compared to conventional liposomes. All inoculations were susceptible to CPO in its free form, presenting fungistatic activity between 0.3 and 0.61 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and fungicidal activity between 1.22 and 4.88 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. There was no difference with respect to antimycotic activity between conventional and stealth liposomal formulations. Fungistatic activity of liposomes was observed at concentrations ranging from 1.22 and 2.44 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Fungicidal concentration range was 1.22-9.76 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The URA5 profile analized demonstrated all isolates are VNI genotype (*C. neoformans*). The treatment with Lipo-CPO showed a reduction of 8% of the *C. neoformans* population in spleen, 40.8% in liver, 63% in lungs and 89% in brain after 14 days of infection. Histological examination revealed cell infiltrate either Lipo-CPO or Amphotericin B treated groups, but less intense when compared to control group. The results suggest that Ciclopirox olamine loaded-liposomes have significant antimycotic activity against *Cryptococcus* spp, reinforcing its potential for *in vivo* studies and its application in cryptococcosis treatment.

Keywords: Cryptococcosis, Ciclopirox olamine liposomal, Release kinetic *in vitro*, Antifungal activity *in vitro*, experimental cryptococcosis.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1 - Contribuição global de autores Brasileiros no campo da criptococose em comparação aos autores americanos. (A)** Variação anual (1991–2010) da percentagem de artigos contendo autores brasileiros ou americanos **(B)** Análise do perfil de produtividade científica comparando estudos onde os autores brasileiros estiveram em qualquer posição da lista de autores com artigos onde os cientistas brasileiros estiveram na posição senior **(C)** Análise detalhada de perfis mostrando distribuição de artigos por autores envolvendo os principais países, incluindo o Brasil. **16**
- Figura 2 -** Ciclo de infecção de *Cryptococcus* spp. (Adaptado de Lin e Heitman, 2006). **17**
- Figura 3 -** Métodos diagnósticos utilizados na identificação de *Cryptococcus* spp. I) *C. neoformans* no líquido contra-corado com Tinta da China 40X; II) Aspecto mucóide de *C. neoformans* em ágar-Sabouraud 2% de glicose; III) Colônia de *C. neoformans* em meio Ágar Semente de Niger com formação de melanina; IV) Uréia de Christensen. A - Teste negativo, A – Teste positivo; V) Auxonograma- Halos evidenciando crescimento fúngico; VI) Meio CGB: a) *C. neoformans* b) *C. gattii*; VII) Teste de Aglutinação em látex para detecção de antígeno; VIII) Gel de agarose 3% representativo de amplificação utilizando primer URA5 cortado com enzimas de restrição *Sau96I* e *HhaI* para identificação de *C. neoformans*. **31**
- Figura 4 -** Fórmula estrutural da 2-aminoetanol sal do 6-ciclohexil-1-hidroxi-4-metil-2-piridona. **42**
- Figura 5 -** Estrutura do lipossoma e da bicamada lipídica (Adaptado de Chorilli et al., 2004). **47**
- Figura 6 -** Características estruturais de lipossomas convencionais, furtivos, sítio-específicos e catiônicos (Adaptado de LASIC, 1996). **48**

ARTIGO 1

- FIG 1** Chemical structure of 6-cyclohexyl-1-hydroxy-4-methylpyridin-2(1H)-one and 2-aminoethanol (ciclopirox olamine). **83**
- FIG 2** Scatter plot of the formulations produced using a 2^{4-1} fractional experimental design **98**

and effects of response variables: Encapsulation efficiency (%), PDI and Mean size (nm). The liposomal formulations were identified with codes from 1 up to 11. Formulations indicated gray circles were unstable and black circles were stable, respectively. The best formulations were indicated with a square.

FIG 3 Release kinetics of CPO from conventional (L11, ●) and stealth liposomes (L11', ■) in pH 7.4 phosphate buffer solution at 37 °C. Data are expressed as mean ± S.D. (n=3). **100**

ARTIGO 2

Fig.1. The *URA5* RFLP profiles after double digestion of amplification products with the enzymes *Sau96I* (10 U/μL) and *HhaI* (20 U/ μL) of thirty *Cryptococcus* isolates obtained from cerebrospinal fluid of patients **118**

Fig. 2. Bands patterns of microsatellite obtained after PCR amplification of thirty *Cryptococcus* isolates, obtained from cerebrospinal fluid of patients admitted in public hospitals of Recife, Pernambuco, Brazil **119**

ARTIGO 3

FIG 1 Leukocyte cell counts in dexamethasone-immunosuppressed mice infected with *Cryptococcus neoformans* URM5811 and treated with Ciclopirox olamine-Loaded Liposome. EL= Empty Liposome; AmB= Amphotericin B; Lipo-CPO= Ciclopirox olamine-loaded liposome. *P < 0.05, 7 days compared to 14 days of treatment per cell group (ANOVA and Tukey test). **135**

FIG 2 Seven days after infection, mice were treated daily with Lipo-CPO (0.5 mg/kg Lipo-CPO) or amphotericin B (0.5 mg/kg) for 7 (A) or 14 days (B). *P < 0.05 compared to the empty liposome group (Tukey test and ANOVA). **136**

FIG 3 Histopatological examination of cryptococcosis infection model: 2A and 2B show normal glomerulus and tubular cells and hepatocytes without vascular alterations, respectively, indicating ausence of CPO citotoxicity at 12.5 mg/Kg; 2C-2E demonstrate cell infiltrate in the liver of empty liposome, Lipo-CPO and AmB groups after 7 days of infection. The histological damage in brain after 7 days is shown in 2F-2H. Liquefative and coagulative necrosis are indicated by white and black stars respectively. Yellow arrow indicates inflammatory infiltrates naer the lesion (400x). **137**

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1- Características fenotípicas, epidemiológicas e genéticas de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	52
--	-----------

ARTIGO 1

Table 1. Pre-formulation studies for encapsulation of Ciclopirox olamine into liposomes	97
Table 2. Two-level 2^{4-1} fractional experimental design to study the influence of lipids concentrations and CPO amount on the characteristics of the CPO-loaded liposomes.	99
Table 3. Susceptibility testing of ciclopirox olamine free and encapsulated in conventional and stealth liposomes against <i>Cryptococcus</i> strains obtained from Cerebrospinal Fluid.	101

ARTIGO 2

Table 1. Phenotypic and Molecular determination of the <i>Cryptococcus</i> strains	117
--	------------

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 - Criptococose: vias de infecção e manifestação clínica.....	15
2.2 - Criptococose experimental.....	19
2.3 - <i>Cryptococcus neoformans</i>	21
2.3.1 - Histórico e aspectos epidemiológicos.....	21
2.4 - Métodos utilizados para identificação de <i>Cryptococcus</i> spp.....	28
2.5 - Terapia na Criptococose e Teste de susceptibilidade a antifúngicos.....	36
2.6 - Ciclopirox olamina.....	41
2.7 - Nanotecnologia Farmacêutica.....	45
2.7.1 Sistemas de liberação de fármacos.....	45
3 REFERÊNCIAS.....	53
4 CAPÍTULO 1	
Phenotypic and genotypic determination of <i>Cryptococcus neoformans</i> clinical isolates. <i>A ser submetido à Mycopathologia</i>	81
5 CAPÍTULO 2	
Antifungal activity of ciclopirox olamine loaded-liposomes against <i>Cryptococcus neoformans</i> . <i>A ser submetido à Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i>	103
6 CAPÍTULO 3	
Antifungal activity of ciclopirox olamine-loaded stealth liposomes in mice infected with the human fungal pathogen <i>Cryptococcus neoformans</i> . <i>A ser submetido à</i> <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i>	121
7 CONCLUSÕES.....	126
8. ANEXOS.....	127

1 INTRODUÇÃO

A criptococose, infecção fúngica oportunista, cujo principal agente etiológico é a levedura encapsulada *Cryptococcus neoformans*, vem assumindo um papel relevante na atualidade por ser uma das micoses mais comuns em pacientes imunocomprometidos com mal prognóstico. A inalação das estruturas viáveis desta levedura constitui a principal via de contaminação, podendo a micose ser cutânea, pulmonar ou acometer outros órgãos, principalmente meninges (LIN; HEITMAN, 2006; PARK et al., 2009; ALBUQUERQUE; RODRIGUES, 2012).

Cryptococcus neoformans era reconhecido por apresentar três variedades: *C. neoformans* var. *neoformans*, *C. neoformans* var. *gattii* e *C. neoformans* var. *grubii*. Em 2002, avanços nas pesquisas envolvendo a ecologia, a epidemiologia, a fisiologia e a genética de *C. neoformans* permitiram que Kwon-Chung e colaboradores elevassem *C. neoformans* var. *gattii* a uma nova espécie: *Cryptococcus gattii*. Com base nestas informações, as antigas variedades são reconhecidas atualmente por vários autores como espécies e variedades do complexo *C. neoformans*, as quais correspondem *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, *C. neoformans* var. *grubii* e *C. gattii*. As espécies apresentam diferenças quanto à epidemiologia, fisiologia, características moleculares e padrão de resistência aos antifúngicos (KWON-CHUNG et al., 2002; RIBEIRO; NGAMSKULRUNGROJ, 2008; BYRNES et al., 2010; GUPTA; FRIES, 2010; SAN-BLAS; BURGER, 2011).

O aparecimento de isolados de *Cryptococcus* resistentes aos fármacos mais utilizados no tratamento da criptococose, como a anfotericina B, tem se tornado um problema frequente. As opções terapêuticas são limitadas, particularmente devido à toxicidade, resistência fúngica e intolerância aos medicamentos (NUCCI; MARR, 2005).

Diante deste contexto, diversos agentes antifúngicos têm sido desenvolvidos e avaliados para o acompanhamento e tratamento de infecções fúngicas. Entre os agentes, encontra-se um derivado da classe das hidroxipiridonas, a ciclopirox olamina, cuja atividade antifúngica foi descrita em 1973. Este fármaco apresenta amplo espectro de ação antimicrobiana, antiinflamatória, antitumoral e excelente penetração tissular, sendo eficaz contra fungos de interesse médico como as leveduras (NIEWERTH et al., 2003). Contudo, pesquisas *in vivo* relacionadas ao uso da ciclopirox olamina no tratamento da criptococose

sistêmica ainda não foram realizadas até o momento, sobretudo quando se refere ao encapsulamento de fármacos através de sistemas nanoestruturados como os lipossomas (SHAIKH; PAWAR, 2010).

Os lipossomas são ferramentas importantes na elucidação do mecanismo de ação de vários fármacos sobre as mais complexas membranas biológicas, assim como veicular medicamentos em locais determinados minimizando os efeitos adversos encontrados na terapia convencional (SANTOS-MAGALHÃES et al., 2000; RODRIGUES et al., 2001; ZHANG; GRANICK, 2006; CAVALCANTI et al., 2011).

As vantagens do uso de lipossomas como sistema de liberação de fármacos incluem o tamanho e característica da superfície da partícula que pode ser facilmente manipulada para alcançar o sítio alvo; controle e estabilidade do fármaco no transporte aumentando a eficácia terapêutica e reduzindo os efeitos colaterais; incorporação do fármaco no sistema sem outra reação química preservando a atividade do fármaco; utilização do sistema através de várias formas de administração como nasal, oral, intra-ocular, parenteral entre outras (MAJET; KUMAR, 2000; BIRNBAUM; BRANNON-PEPPAS, 2003; MOHANRAJ; CHEN, 2006; PEER et al., 2007; DAVIS; CHEN; SHIN, 2008; ZHANG et al., 2008; OLSON et al., 2010).

Com o intuito de desenvolver novas alternativas terapêuticas para o tratamento da criptococose, o presente estudo teve como objetivo caracterizar e avaliar a ação *in vitro* da ciclopirox olamina livre e encapsulada em lipossomas frente amostras de *Cryptococcus neoformans* para futura aplicação no tratamento da criptococose sistêmica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Criptococose: vias de infecção e manifestação clínica

A criptococose, conhecida anteriormente por Torulose, Blastomicose Européia ou Doença de Busse- Buschke, é uma micose de evolução aguda, subaguda ou crônica, potencialmente fatal, que vem assumindo um papel relevante na atualidade por ser uma das micoses mais comuns em pacientes imunocomprometidos (PARK et al. 2009; FRIES; COX, 2011). Além do homem, a doença pode acometer animais domésticos, principalmente cão e gato; além de animais silvestres (LIN; HEITMAN, 2006).

Em humanos, a criptococose é comumente diagnosticada em pacientes com imunodepressão celular, como os soropositivos para o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Nos últimos anos, o aumento do número de casos da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida foi acompanhado pelo aumento da incidência de criptococose (PAPPALARDO; MELHEM, 2003; PARK et al. 2009; FRIES; COX, 2011). Dessa forma, esta micose atualmente é considerada a doença oportunista com alto índice de morbidade e mortalidade (PARK et al., 2009; ALBUQUERQUE; RODRIGUES, 2012).

Segundo levantamento realizado por Park e colaboradores em 2009, estima-se que aproximadamente 1,000,000 de casos de meningite criptocócica ocorram a cada ano em pacientes com AIDS, resultando 600,000 mortes no período de três meses de infecção (PARK et al., 2009). No Brasil, a doença foi recentemente caracterizada como a micose que causa maior número de mortes neste grupo de pacientes (PRADO et al., 2009). Com base nestes dados, Albuquerque e Rodrigues (2012) em sua revisão sobre o perfil da criptococose e espécies patogênicas de *Cryptococcus* nos últimos 20 anos, verificaram que o Brasil e em segundo lugar, os Estados Unidos, são os responsáveis pela produção técnico-científica na área. Especificamente no Brasil, os principais estados responsáveis por tal produção são Minas Gerais (15%), São Paulo (25%), Rio de Janeiro (31%) e Rio Grande do Sul (16%) (Figura 1).

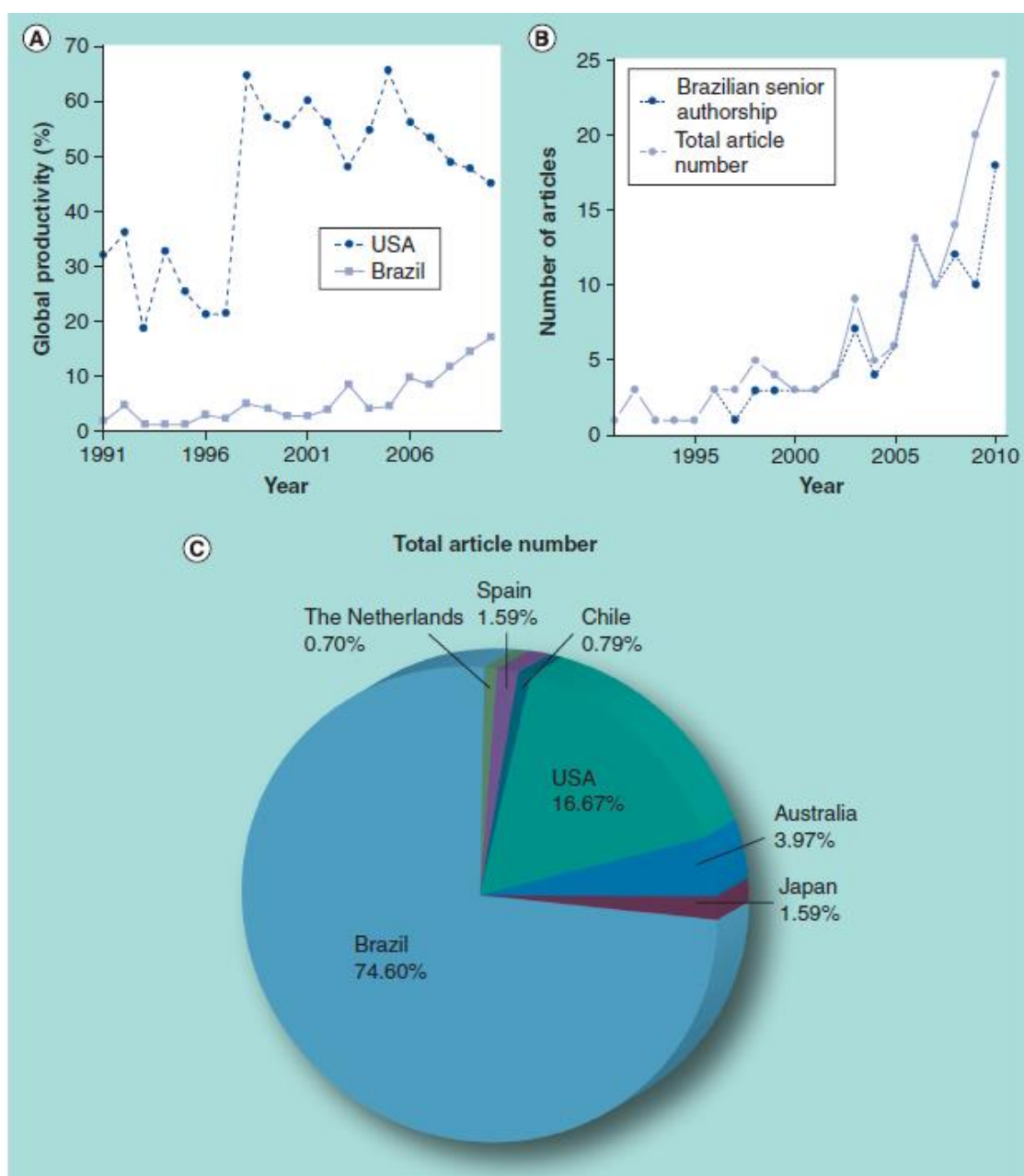


Figura 1. Contribuição global de autores Brasileiros no campo da criptococose em comparação com autores americanos. (A) Variação anual (1991–2010) da percentagem de artigos contendo autores brasileiros ou americanos **(B)** Análise do perfil de produtividade científica comparando estudos onde os autores brasileiros estiveram em qualquer posição da lista de autores, com artigos onde os cientistas brasileiros estiveram na posição senior **(C)** Análise detalhada de perfis mostrando distribuição de artigos por autores envolvendo os principais países, incluindo o Brasil. (ALBUQUERQUE; RODRIGUES, 2012).

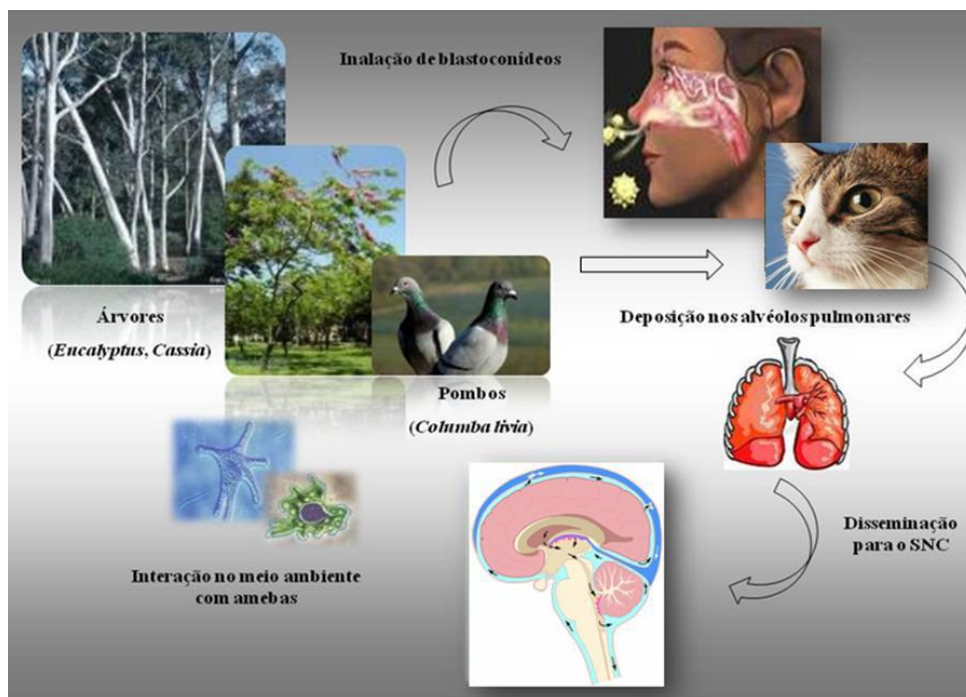
Com relação ao fungo, vários autores consideram *C. neoformans* como pertencente a um complexo formado por espécies e variedades, as quais correspondem *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, *C. neoformans* var. *grubii* e *C. gattii* (BYRNES et al., 2010;

GUPTA; FRIES, 2010; PEDROSO et al., 2010; DELIO et al., 2010; SAN-BLAS et al., 2011; ALBUQUERQUE; RODRIGUES, 2012).

Além destas, Khawcharoenporn e colaboradores (2007) afirmam que *C. albidus* e *C. laurentii*, consideradas sapróbias, foram relatadas como agentes de infecção. Os mesmos autores citam outras espécies isoladas de material clínico, consideradas, contudo, de menor importância como *C. uniguttulatus*, *C. curvatus*, *C. adeliensis*, *C. humiculus*, *C. luteolus* e *C. macerans*.

De acordo com Honsho et al. (2003) e Kommers et al. (2005), a primo infecção por *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. gattii* é pulmonar, seguida de disseminação. A alta prevalência da levedura em isolados ambientais, aliada a rara transmissão homem-homem ou animal-animal, indica que a infecção é adquirida através de fontes ambientais do fungo, especialmente a partir de inalação de blastosporos oriundos de excretas de aves (Figura 2). Porém, a criptococose pulmonar não possui características específicas, logo, o diagnóstico diferencial torna-se difícil. Esta ausência de sintomas proporciona o aumento de casos subdiagnosticados de criptococose, principalmente em pacientes imunocompetentes (ZHU et al., 2002).

Figura 2. Ciclo de infecção de *Cryptococcus* spp.



Fonte: Adaptado de LIN; HEITMAN, 2006.

De acordo com Hull; Heitman (2002) e Abegg et al. (2006), algumas evidências corroboram com o fato da infecção primária ser nos pulmões como a identificação de excretas de aves como reservatório ambiental e a descoberta, de partículas infecciosas com tamanho compatível com a deposição alveolar (0,5 a 2 μm). Associado a isto, estão o reconhecimento de pneumonia criptocócica e a descrição de nódulos subpleurais.

Segundo Núñez et al. (2000), a infecção pulmonar primária no imunocompetente é, na maioria das vezes, assintomática e regressiva, com resposta imunológica e evolução para cura. Entretanto, de acordo com Vilchez et al. (2002) e Casali et al. (2003), a partir de uma lesão pulmonar no imunodeprimido, pode haver progressão, com disseminação por via linfohematogênica, para outros sistemas, em especial para o sistema nervoso central (SNC). Neste órgão, meningoencefalite fúngica é a forma clínica mais freqüente com 75% dos casos.

No sistema nervoso central, além da meningoencefalite criptocócica, podem ocorrer quadros de meningite e encefalite. A sintomatologia inclui cefaléia e mudança comportamental, podendo evoluir para sinais de irritação meníngea e vômitos. Em casos mais graves, verifica-se confusão mental, apatia e edema papilar. Observada sob a forma de meningoencefalite, pode ter curso fulminante e de outra forma, pode representar uma reativação de foco latente ou eclodir em virtude de reinfecção por nova exposição ao agente (CASALI et al., 2001; PAPPALARDO; MELHEM, 2003; CORTI et al., 2008).

Bivanco; Machado; Martins (2006); Dilhuydy et al. (2007) e Dillon et al. (2011) afirmam que além de acometer os sistemas respiratório e nervoso, a criptococose pode manifestar-se através de lesões cutâneas visualizadas principalmente na face e membros superiores, sendo representada por mácula avermelhada, pápulas, pústulas, nódulos ou úlceras. Em indivíduos que fazem uso de corticosteroides, é observado vasculite com eritema e endurecimento. Porém, este tipo de manifestação clínica da criptococose é menos comum, mais prevalente no norte da Europa, e atinge cerca de 10% a 15% dos pacientes.

Segundo Idnurm et al. (2005), a prevalência de infecção por *C. neoformans* está diretamente relacionada com o grau de exposição à levedura e com a condição imune do hospedeiro. De acordo com Reolon et al. (2004); Núñez et al. (2000); Moreira et al. (2006) e Lin; Heitman (2006) e Corti et al. (2008), os primeiros relatos da infecção revelam imunodepressão celular em função do uso de corticóides, diabetes mellitus, linfoma e lúpus eritematoso sistêmico. Além disso, soma-se a esses grupos de risco, indivíduos sob antibioticoterapia, leucêmicos, transplantados e portadores de tumores, alterando dessa forma o perfil epidemiológico para a patologia.

2.2 Criptococose experimental

Os modelos de infecção experimental são importantes para o estudo da patogênese e para o acompanhamento do tratamento. Estes ocupam posição essencial no estudo de doenças infecciosas como resultado de problemas éticos da exposição de seres humanos a agentes potencialmente letais (WILES et al., 2006).

A indução de infecções em modelos animais bem definidos fornece informações a cerca do processo da doença, aproximando-se do contexto natural, apesar das diferenças existentes entre as infecções naturais e as induzidas. O modelo é somente uma representação do processo natural da doença, e deverá ser apropriado para o processo que se deseja estudar, envolvendo vários fatores, como por exemplo, a integração do conhecimento com os múltiplos ambientes em que a doença se estabelece (WILES, et al., 2006).

No estudo da criptococose, os modelos mais utilizados são ratos, coelhos e camundongos para avaliar principalmente a patogenicidade, os fatores de virulência do micro-organismo, a imunidade do hospedeiro e a eficácia de fármacos antifúngicos. A escolha da espécie animal e a via de inoculação do micro-organismo depende do objetivo e do grau de reprodutibilidade desejado (PERFECT, 2005).

Segundo Casadevall; Perfect (1998) podem ser utilizadas para indução da criptococose as vias: intraperitoneal, intracerebral, intravenosa, intranasal e intratraqueal. Contudo, a via intraperitoneal é a mais escolhida pela facilidade de inoculação. A intravenosa também é uma técnica importante quando aplicada, pois trata-se análise quantitativa e padronizada, além de fornecer respostas a respeito da disseminação do micro-organismo para os diferentes órgãos.

Segundo Wickes; Kwon-Chung (2002) e Perfect (2005), os camundongos são os animais de laboratório mais susceptíveis à infecção por *Cryptococcus*, bem como são modelos mais indicados pelo baixo custo, pela facilidade no manuseio, e devido à disponibilidade de diversas linhagens geneticamente conhecidas. De acordo com os autores, as infecções nestes animais podem ser subclínicas ou letais a depender do tamanho do inóculo, via de inoculação e virulência do isolado. Quanto aos animais, o sucesso da infecção dependerá da linhagem e do estado imunológico.

Conforme Segal; Baum (1994), quando se trata de infecção experimental, alguns estudos podem ser conduzidos avaliando a disseminação e o tropismo do micro-organismo para diferentes tecidos, assim como a sobrevivência do hospedeiro e a resposta terapêutica.

A quantificação da carga antifúngica em diferentes órgãos permite avaliar a disseminação do micro-organismo e sua depuração pelo hospedeiro. A avaliação da sobrevivência do hospedeiro é feita determinando-se a taxa de sobrevivência ou de morte dos

animais, de acordo com o período de tempo após a infecção experimental. A análise dever ser padronizada com relação ao peso, idade e padrão de resposta imunológica, comparando-se os tempos de evolução da infecção até a morte do animal (CHRETIEN et al., 2002; WICKES; KWON-CHUNG, 2002).

Capilla e colaboradores (2006) utilizaram em suas pesquisas um modelo experimental de criptococose para analisar o efeito da imunodeficiência e imunossupressão induzida por glicocorticoides pós-infecção induzida por via intravenosa com *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* e *C. gattii* em camundongos da linhagem BALB/c. Os camundongos imunocompetentes foram infectados por via endovenosa com um inóculo de 10^6 células/mL de *Cryptococcus gattii* e os camundongos imunossuprimidos foram infectados com inóculo de 10^5 células/mL de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. Os autores verificaram que os camundongos infectados com *C. gattii* desenvolveram mais frequentemente lesões externas e prolapso retal. A análise quantitativa das unidades formadoras de colônia demonstrou maior colonização da levedura no cérebro, fígado e pulmões em camundongos infetados por *C. neoformans* var. *neoformans*.

Medeiros et al. (2010), verificaram a atividade antifúngica do fitoterápico beta-lapachona em um modelo de criptococose disseminada por *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* utilizando camundongos suíços imunossuprimidos com dexametasona (0,5 mg/camundongo). No estudo, a anfotericina B foi utilizada na concentração de 0,5 mg/Kg para fins de comparação, uma vez que é o fármaco de escolha para o tratamento da criptococose. A análise quantitativa das unidades formadoras de colônias foi realizada a partir de fragmentos do baço, fígado, rins, pulmão e cérebro. Como resultado, os autores observaram que o tratamento com β -lapachona (10 mg/Kg) reduziu significativamente a quantidade de levedura no baço, pulmão e fígado sete dias após a infecção. Além disso, o fungo foi eliminado do baço e fígado e teve sua carga reduzida em aproximadamente 10^4 vezes nos pulmões e cérebro após 14 dias de infecção quando comparado com o grupo controle. A histopatologia revelou necrose liquefativa e infiltrado celular no cérebro em ambos os grupos tratados com β -lapachona e anfotericina B.

De acordo com Graybill (2000) e Medeiros et al. (2010), a utilização de um modelo animal para estudo da eficácia de fármacos é fundamental para o entendimento dos mecanismos de virulência de micro-organismos como leveduras do gênero *Cryptococcus* e para propor novas alternativas, sendo esse um caminho essencial no trajeto de estudos *in vitro* até seu uso em pacientes.

2.3 *Cryptococcus neoformans*

2.3.1 Histórico, características morfofisiológicas e aspectos epidemiológicos

O gênero *Cryptococcus* reúne aproximadamente 38 espécies de leveduras, fungos unicelulares, que se reproduzem predominantemente por brotação e caracterizam-se, em geral, por apresentar cápsula mucopolissacarídica, colônia mucóide, capacidade assimilativa a várias fontes de carbono, capacidade de produzir melanina; ausência de capacidade fermentativa e sensibilidade a cicloheximida (BARNETT et al., 2000; DE HOOG et al., 2000; IKEDA et al., 2002).

Estudos envolvendo a levedura iniciaram-se em 1894 com o pesquisador Francesco Sanfelice, analisando “blastomicetos” do suco de algumas frutas, isolou a partir do suco de pêssago um micro-organismo com estrutura semelhante a uma levedura encapsulada, o qual denominou de *Saccharomyces neoformans*. O referido isolado foi inoculado experimentalmente em animais, sendo capaz de produzir lesões. Este trabalho, publicado pela Revista do Instituto de Higiene da Universidade de Cagliari (Itália), foi o marco inicial para outros estudos (BIVANCO; MACHADO; MARTINS, 2006).

Na mesma época, Otto Busse, um patologista, e Abraham Buschke, um clínico, relataram separadamente o isolamento de um fungo com as mesmas características, proveniente de uma lesão na tíbia, semelhante a um sarcoma, de uma mulher com 31 anos. Busse descreveu o organismo como fungo, resistente ao tratamento com hidróxido de sódio e o denominou *Saccharomyces* sp. (LACAZ et al., 2002a; SIDRIM; ROCHA, 2004; BIVANCO; MACHADO; MARTINS, 2006).

Na Itália, outro organismo similar à levedura obtida por Bushcke foi isolado por Sanfelice (1895), desta vez a partir de um linfonodo de um boi, o qual nomeou *S. lithogenes*. Curtis (1896) descreveu um caso similar ao relatado por Busse e Buschke, isolando o agente a partir de uma lesão tumoral no quadril, o qual foi denominado *S. tumefasciens*. Constantin, em 1901, considerou essa espécie como *S. hominis*, agente da chamada blastomicose européia (RIPPON, 1982; LACAZ et al., 2002a; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Em 1902, Frothingam reconheceu a mesma espécie em uma lesão pulmonar em um cavalo, em Massachussetts. Estes últimos achados estabeleceram o fato de que a doença acomete tanto animais quanto humanos (RIPPON, 1982; MITCHELL; PERFECT, 1995).

Após examinar as várias culturas isoladas, o micologista francês Vuillemin (1901) não visualizou ascósporos, característicos do gênero *Saccharomyces* e as transferiu para o gênero *Cryptococcus*, previamente estabelecido por Kützing (1833), ao demonstrar que o termo

anterior era inadequado, sendo considerados, então, como *C. hominis* os isolados de Busse e Buschke e *C. neoformans*, o de Sanfelice (RIPPON, 1982; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Von Hansemann (1905) é citado como o primeiro a observar a levedura causando meningite, e esta forma clínica da micose não era diagnosticada *ante mortem* até Verse relatar um caso em 1914 (RIPPON, 1982; MITCHELL; PERFECT, 1995).

Em 1916, nos Estados Unidos, Stoddard e Cutler observaram alguns casos de blastomicose com lesões cutâneas e sistêmicas, de onde isolaram uma levedura por estes denominada *Torula histolytica* e a doença torulose. Os autores evidenciaram retração da cápsula da levedura em meio às lesões tissulares e interpretaram erroneamente como uma lise celular causada pelo fungo no tecido hospedeiro (RIPPON, 1982; LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Rhoda Benham (1935) revisou os isolados identificados como *Saccharomyces*, *Cryptococcus* e *Torula*, analisando morfologia, patogenicidade e reatividade frente a fatores séricos, concluindo que todos pertenciam a um só gênero. Em 1950, essa mesma autora propôs a designação *C. neoformans* (Sanfelice) Vuillemin 1901, que se tornou definitiva, sendo esta espécie, o principal agente etiológico da criptococose (RIPPON, 1982; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Outros autores, embora indicando *C. neoformans* como agente etiológico predominante na criptococose, também relatam a ocorrência de outras espécies como *C. laurentii* e *C. albidus*, porém em menor frequência (MCCURDY; MORROW, 2001; AVERBUCH et al., 2002; LEE et al., 2004).

Em 1951, Emmons relatou pela primeira vez a fonte de infecção, afirmando a presença da levedura no solo. Após quatro anos, o mesmo autor detectou cepas virulentas de *C. neoformans* em excretas e ninhos de pombos e observou quadros de pneumonia grave da criptococose em trabalhadores que demoliam prédios antigos (EHRENSING; SAAG, 2001).

Em 1978, Kwon-Chung propôs o gênero *Filobasidiella* para a fase sexual com duas variedades *F. neoformans* var. *neoformans* (sorotipos A, D e A/D), sendo descrita como teleomorfo de *C. neoformans* var. *neoformans* e *F. neoformans* var. *bacillispora* (sorotipos B e C), correspondendo ao teleomorfo de *C. neoformans* var. *gattii* (ZAITZ et al., 1998). As duas variedades eram as únicas reconhecidas para *C. neoformans* até que FRANZOT et al. (1999) identificaram uma terceira variedade denominada *C. neoformans* var. *grubii*.

Em 2002, avanços nas pesquisas envolvendo a ecologia, epidemiologia, fisiologia e genética de *C. neoformans* permitiram que Kwon-Chung e colaboradores elevassem *C. neoformans* var. *gattii* a uma nova espécie: *Cryptococcus gattii*. Com base nestas informações,

as antigas variedades são reconhecidas atualmente por vários autores como espécie e variedades do complexo *C. neoformans*, as quais correspondem *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, *C. gattii* e *C. neoformans* var. *grubii*. (BYRNES et al., 2010; ALBUQUERQUE; RODRIGUES, 2012).

De acordo com Meyer et al. (2003); Enanche-Angoulvant et al. (2007); Bovers; Hagen; Boekhout (2008); Consenso em criptococose (2008) Huston; Mody (2009); Delio et al. (2010) e Albuquerque; Rodrigues (2012), *C. neoformans* e *C. gattii*, assim como outros micro-organismos, possuem características fenotípicas, epidemiológicas e genéticas que permitem classificá-los em nível de variedades, sorotipos e tipos moleculares (tabela 1).

Cryptococcus neoformans var. *neoformans* e *C. gattii* desenvolvem-se *in vitro* entre 48 e 72h, produzindo colônias mucóides, lisas, de coloração branca a creme, sendo o grau de mucosidade da colônia dependente da formação da cápsula mucopolissacarídica (ZARAGOSA et al., 2006).

A presença da cápsula mucopolissacarídea é uma característica distinta entre as espécies, sendo considerada importante fator de virulência, antifagocítico e imunodepressor. Aproximadamente 90% da cápsula é constituída pelos polissacarídeos glucuronoxilomanana, galactoxilomanana e manoproteína (CASALI et al., 2001; NISHIKAWA et al., 2003).

Segundo Zaragosa et al. (2006), a diferença na estrutura das glucuronoxilomananas da parede celular permitiu a identificação dos cinco sorotipos conhecidos atualmente, todos patogênicos para o homem: *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (sorotipos D e AD), *Cryptococcus gattii* (sorotipos B e C) e mais recentemente, *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (sorotipo A). O tamanho da cápsula é determinado pelo genótipo e condições de crescimento, apresentando a levedura pequenas cápsulas quando no ambiente e cápsulas espessas durante a infecção.

No aspecto micromorfológico, observa-se células de leveduras globosas ou alongadas, com ou sem brotamento. Pseudohifas estão ausentes ou são rudimentares (REOLON et al., 2004; BIVANCO; MACHADO; MARTINS, 2006). Este patógeno oportunista é detectado em indivíduos imunocompetentes e imunologicamente comprometidos, bem como em detritos de origem vegetal, frutas, pele de animais, e principalmente em excretas de pombos e outras aves, onde pode permanecer viável por mais de dois anos (LARSSON et al., 2003; PEREIRA; COUTINHO, 2003; TABOADA, 2004).

A criptococose por *C. neoformans*, representa a quarta causa mais freqüente de infecção oportunista em pacientes com AIDS. Dentre as infecções fúngicas, esta micose é a principal responsável pela morbidade e mortalidade desses pacientes. Na maioria dos países, a

prevalência da infecção em pacientes com AIDS tem se mantido na faixa de 5 a 10%, enquanto que este índice chega a 15-50% em países africanos (DUIN et al., 2002; JAIN et al., 2005; ALBUQUERQUE; RODRIGUES, 2012).

No Brasil, pesquisas mostram que 4,5% das infecções oportunistas associadas a pacientes portadores de HIV são causadas predominantemente por *C. neoformans* var. *neoformans*. Além disso, a mortalidade em pacientes com criptococose, com ou sem doença predisponente, fica em torno de 40 a 66% (CORRÊA et al., 1999; DARZÉ et al., 2000; PAPPALARDO; MELHEM, 2003; JANBON, 2004). Apesar da importância de uma melhor compreensão da amplitude da epidemia do HIV/SIDA nas diferentes regiões do país, não há dados precisos da epidemiologia da criptococose na região Nordeste do Brasil. A caracterização clínica e epidemiológica da doença se reflete no desenvolvimento de estratégias de prevenção e definição das bases para a assistência médica aos doentes infectados (ALBUQUERQUE; RODRIGUES, 2012).

Fernandes et al. (2000), realizaram estudo sobre a prevalência da meningoencefalite criptococócica em 50 pacientes com AIDS provenientes do Hospital de Doenças Tropicais de Goiânia e relataram que todos apresentaram as manifestações clínicas características de criptococose meningoencefálica como cefaléia, vômito e ocasionalmente febre. As amostras foram submetidas ao exame direto com tinta da China e as variedades detectadas através do meio CGB, com percentagem de 94% de *C. neoformans* var. *neoformans*. De acordo com os autores, a identificação de *C. gattii* em três casos (6%), foi considerado de grande importância, visto que mesmo em regiões endêmicas de criptococose, onde *C. gattii* é mais freqüente, este agente tem sido raramente correlacionado com criptococose do SNC em portadores do vírus da imunodeficiência adquirida.

Da mesma forma, Silva et al. (2008), utilizando meio L- Canavanina Azul de Bromotimol (CGB) para a detecção de *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. gattii* isoladas de 35 pacientes com criptococose atendidos no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo (HE-UFTM), verificaram que *C. neoformans* var. *neoformans* foi prevalente, encontrada em 88,6% dos casos. A maioria dos pacientes acometidos de criptococose foi do sexo masculino, correspondendo a 85,7% dos casos (n=30), sendo 42,8% na faixa etária entre 30 e 40 anos. Com relação à sorologia para HIV, 85,7% dos pacientes tinham sorologia positiva.

Moreira et al. (2006), afirmam que a maioria dos estudos envolvendo espécies de *Cryptococcus* e criptococose, ressaltam mais os aspectos clínicos e terapêuticos, contudo, a epidemiologia e caracterização das espécies do complexo *C. neoformans* também são

importantes para um melhor prognóstico dos pacientes. Os autores realizaram um estudo prospectivo de 96 pacientes, enfocando aspectos clínico-epidemiológico e laboratorial das espécies da levedura no período de 1996-2003.

Segundo Casali et al. (2001) e Igreja et al. (2004), a recorrência da infecção por *Cryptococcus* spp. em pacientes com AIDS, sendo esta, resultante da reativação da infecção, ou causada por linhagens novas, é um problema crescente. Segundo Rozenbaum e Gonçalves (1994), 15 a 25% dos pacientes sem AIDS e aproximadamente 50% dos pacientes soropositivos para o vírus (HIV) podem apresentar recorrência da infecção.

O fungo é mais frequentemente isolado de casos de criptococose em homens adultos (DARZÉ et al., 2000; FERNANDES et al., 2003; MEYER et al., 2003; PAPPALARDO; MELHEM, 2003; LITVINTSEVA et al., 2005). Por razões desconhecidas, Fernandes et al. (2000) afirmam que a incidência da doença em crianças é baixa. Entretanto, no Brasil, houve um incremento nos relatos da criptococose nessa faixa etária (CORRÊA et al., 1999), estando esse ligado à migração da população da área urbana para a área rural, desnutrição ou ao aumento do número de crianças imunocomprometidas. Rozenbaum e Gonçalves (1994) afirmam que a exposição ao agente ocorre quando os indivíduos ainda são jovens, havendo reativação da infecção latente na idade adulta.

Segundo Reolon et al. (2004) e Nielsen et al. (2007), *C. neoformans* var. *neoformans* possui distribuição cosmopolita e tem sido isolado de várias fontes na natureza principalmente a partir de excretas de pombos e outras aves. Parece não infectar as aves devido a sua temperatura média corporal (42°C) e é capaz de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal desses animais que constituem vetores da micose. Outras fontes ambientais são vegetais em decomposição, laticínios, solo e ocos de árvores. *C. neoformans* var. *neoformans* também é o agente da maioria das infecções criptocócicas em pacientes imunocomprometidos, mesmo em regiões onde a prevalência da *C. gattii* é notória.

Vários autores descreveram a identificação de *Cryptococcus* spp. em fezes e ambientes freqüentados por pombos. Segundo Bernardo; Martins; Martins (2001) e Baroni et al. (2006), excretas de pombos (*Columbia lívia*) são de maior interesse em saúde pública. Esta ave exótica de origem européia foi introduzida no Brasil no século XVI. É encontrada em grande número nos centros urbanos devido a diversos fatores como facilidade de encontrar abrigo e alimento. De acordo com os autores, além da grande capacidade de adaptação e de sua proliferação, o principal problema é que o fungo permanece viável nas fezes secas dessa ave durante muitos anos, tornando-se um reservatório de partículas infectantes passíveis de inalação.

Filiú et al. (2002) descreveram o surto de contaminação de aves de cativeiro por *C. neoformans* var. *neoformans* com repercussão na saúde pública. Foram observadas elevadas concentrações de até 46.000 propágulos viáveis do fungo por grama de material seco na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Segundo os autores, o nível de contaminação observado pode estar relacionado à movimentação das aves nas gaiolas, bem como a presença de substrato para o crescimento do fungo como sementes de Níger, alpiste e girassol.

Reolon et al. (2004), analisando 88 amostras de excreta de aves oriundas de cinco praças de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, verificaram que todas as amostras foram positivas para *C. neoformans* var. *neoformans* nos cinco ambientes estudados pelos autores. A presença de 10 mil unidades formadoras de colônias por grama de material confirma a existência de fontes ambientais do fungo. Os autores afirmam que esta observação possibilita a dispersão e inalação de grande quantidade de propágulos, o que pode determinar a doença em imunocompetentes e imunodeprimidos.

Queiroz et al. (2008) relatam que além de fezes de pombos, *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. gattii* podem ser encontrados em fezes de morcego e restos de colméia de vespas comunitária (*Polybia occidentalis*).

No que diz respeito a *C. gattii*, Melo et al. (1993); Mcdougall; Fyfe (2006) e Queiroz et al. (2008) relatam que esta espécie apresenta distribuição geográfica mais restrita do que *C. neoformans* var. *neoformans*, e teria alcançado várias partes do mundo através de sementes do *Eucalyptus camaldulenses* oriundos da Austrália. Nesse país, *C. gattii* foi isolado a partir de folhas, sementes e cascas de eucalipto. O principal propágulo responsável pela infecção corresponde aos basidiosporos encontrados nas flores dessa árvore e que funcionaria como hospedeiro para o fungo em uma associação biotrófica. No entanto, de acordo com Fernandes et al. (2000), o relato da presença de da levedura em ocos de diferentes árvores como *Cassia grandis*, *Senna multijuga*, e *Ficus microcarpa*, independente de sua espécie, indica novas fontes naturais desse fungo. Dessa forma, pode não haver uma relação definida entre o fungo e um tipo específico de habitat (LAZERA et al., 1998).

Casali et al. (2003) e Abbeg et al. (2006) confirmaram a não especificidade de habitats pelas variedades, ao realizarem no Rio Grande do Sul um estudo com 93 isolados clínicos e ambientais. Entre os isolados ambientais, os nove provenientes de eucaliptos foram identificados como *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) e nenhum isolado de *C. gattii* foi obtido do ambiente. Outro estudo do mesmo grupo obteve 38 isolados de excretas de aves, e destes, 33 foram identificados como *C. neoformans* var. *neoformans* e cinco como *C. gattii* (sorotipo B), sugerindo excretas de aves pelo sorotipo B neste estado.

Em Vancouver, onde houve um surto de criptococose causado por *Cryptococcus gattii* (MACDOUGALL; FYFE, 2006), a incidência de infecção por esta variedade, entre 1999-2003, esteve entre 8,5 e 37 casos por milhões de residentes por ano (KIDD et al., 2004). Na Austrália, esta taxa foi citada por Sorrel (2001) como sendo 8,5 casos por milhão de habitantes/ano descrito, sendo maior do que a taxa total no mesmo país entre 1994 e 1997, que foi de 6,6 casos por milhão de habitantes/ano.

Por razões desconhecidas, *C. gattii* raramente acomete pacientes com HIV e indivíduos imunossuprimidos. Pacientes infectados por esta espécie usualmente são imunocompetentes e respondem lentamente ao tratamento antifúngico (PAPPALARDO; MELHEM, 2003; DIAZ; FELL, 2005; NIELSEN et al., 2007).

2.4 Métodos utilizados para identificação de *Cryptococcus* spp

O diagnóstico laboratorial dos agentes da criptococose baseia-se, principalmente, na visualização de leveduras capsuladas unibrotantes, e mais raramente multibrotantes presentes no espécime clínico em preparações com tinta da China (**figura 3-I**) e no subsequente isolamento do micro-organismo em meio de cultura para sua confirmação (**figura 3-II**) (BIVANCO; MACHADO; MARTINS, 2006; OSUNA et al., 2008; QUEIROZ et al. 2008).

Larsson et al. (2003); Bivanco et al. (2006) e Queiroz et al. (2008) afirmam que vários espécimes como escarro, lavado brônquico, líquido, secreção de lesões cutaneomucosas, urina, macerados de tecidos obtidos por biópsia e sangue periférico, podem ser utilizados para a pesquisa direta da levedura. Porém, segundo Corrêa et al. (2002) e Moreira et al. (2006), o líquido cefalorraquidiano (LCR) representa a amostra ideal, tendo em vista que o principal agente etiológico apresenta tropismo pelo sistema nervoso central.

De acordo com Severo et al. (1998), a preferência pelo SNC se deve à alta concentração, no líquido, de nutrientes como tiamina, ácido glutâmico, glutamina, carboidratos e minerais assimiláveis pelo fungo; ausência de atividade do complemento e a fraca ou ausente resposta inflamatória no tecido cerebral.

Kommers et al. (2005), afirmam que a observação microscópica de *C. neoformans* através da tinta da China, contribui um diagnóstico rápido e barato, sendo importante especialmente na suspeita de meningite criptocócica. A base para a visualização das leveduras por este método é que a cápsula afasta as partículas da tinta, formando um halo claro ao redor da mesma. Contudo, o diagnóstico de criptococose torna-se mais difícil quando se trata de células acapsuladas.

A cultura é o padrão ouro dos métodos de diagnóstico laboratorial micológico para *Cryptococcus neoformans*, embora apresente como limitações o tempo necessário para o desenvolvimento e a identificação do agente etiológico (LACAZ et al., 2002a; QUEIROZ et al., 2008). Por outro lado, Casadevall; Perfect (1998) afirmam que, em certas ocasiões, como por exemplo, na meningite criptocócica crônica, o liquor pode resultar em culturas negativas devido à pequena concentração de leveduras viáveis ao nível lombar (inferior a 10^3 UFC/mL). A baixa concentração é devido a tratamento prévio e torna-se um problema no monitoramento dos pacientes crônicos. As preparações com tinta da China, por sua vez, permanecem positivas por meses após o tratamento e recuperação desse grupo de pacientes.

Moreira et al. (2006) afirmam que para o diagnóstico laboratorial da criptococose, a pesquisa direta demonstrou a presença do micro-organismo em 98,3% das amostras, ocorrendo 100% do isolamento da levedura. Além do LCR, os pesquisadores utilizaram sangue periférico como amostra clínica e relataram que houve falha na detecção do antígeno polissacarídico capsular do fungo em amostra da corrente sanguínea.

Além dos testes supracitados, pode-se realizar o exame histopatológico para visualização do micro-organismo e do dano tissular causado pela infecção. Para a análise histopatológica, podem ser utilizadas colorações de rotina ou alternativas em biópsias como Hematoxilina-eosina (HE), Ácido Periódico de Schiffer (PAS), Azul de Alciano, Metenamina argêntica, Masson-Fontana, sendo eletivo o Mucicarmin de Mayer, o que cora a cápsula fúngica de vermelho (NAMIQ et al., 2005).

Os cortes histológicos corados pelo HE mostram células de *C. neoformans* esféricas, ovais ou elípticas com parede fina rósea ou azul pálido com 5 a 15 μ m de diâmetro. As cápsulas não se coram devido a sua natureza mucopolissacarídica, permanecendo um halo claro que envolve os blastoconídeos. Através da histopatologia é possível visualizar reação inflamatória crônica com linfócitos, histiócitos, macrófagos e células gigantes, o granuloma pode ser observado em alguns casos, sendo a necrose variável, de mínima a abundante, assim como o número de leveduras (BIVANCO; MACHADO; MARTINS, 2006; PEDROSO; CANDIDO, 2006).

Nos tecidos, a coloração com mucicarmim de Meyer é um método útil para diferenciar *C. neoformans* de outros fungos com tamanho e aparências similares, pois evidencia a cápsula em vermelho, facilitando o seu reconhecimento (PEDROSO; CANDIDO, 2006). Outra técnica útil é a coloração Fontana Masson, que pode ser utilizada para evidenciar o depósito de melanina na parede do *C. neoformans*, auxiliando na sua identificação (LAZÉRA; IGREJA; WANKE, 2004; CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008).

Caso não seja possível a visualização microscópica de leveduras capsuladas, sugestivas de *Cryptococcus*, a identificação pode ser realizada ou complementada por micromorfologia e um conjunto de provas bioquímicas da cultura fúngica (DE HOOG et al., 2000; LAZÉRA; IGREJA; WANKE, 2004). Mediante a prova do microcultivo em meio ágar-fubá Tween 80 ou ágar-arroz Tween 80, é possível observar células esféricas de tamanhos irregulares, sem hifas ou pseudo-hifas (diâmetros maiores do que às células de *C. glabrata*) e, algumas vezes, separadas por material capsular.

O gênero *Cryptococcus* é capaz de hidrolisar ureia (**figura 3-IV**), importante para diferenciar das espécies do gênero *Candida*, que não possuem tal característica. *Cryptococcus* spp. não possui habilidade de fermentar carboidratos, mas assimila, por metabolismo oxidativo, açúcares como glicose, maltose, sacarose e Lactose e como fonte de nitrogênio o sulfato de amônio (**Figura 3-V**) (DE HOOG et al., 2000). A capacidade de assimilar inositol como única fonte de carbono pode ser útil para diferenciar das espécies de *Rhodotorula* (WINN JR. et al., 2008).

A assimilação de carboidratos pode ser realizada por procedimentos semi-automatizados e automatizados, como o API 20C (BioMérieux) e o Vitek 2 (BioMérieux), respectivamente, assim como por métodos manuais. Ademais, este gênero não assimila nitrato como única fonte de nitrogênio inorgânico e não realiza redução a nitrito, bem como é sensível a cicloeximida, não crescendo em meios seletivos com sua presença em concentrações acima de 0,2% (LAZÉRA; IGREJA; WANKE, 2004).

A habilidade do gênero *Cryptococcus* de produzir melanina com base em substratos fenólicos presentes em meios de cultura, conferindo às colônias pigmentações escuras, é especialmente útil para isolamentos do fungo de culturas mistas e/ou ambientais (**figura 3-III**) (LAZÉRA; IGREJA; WANKE, 2004; PINTO JUNIOR et al., 2006). A literatura mostra que a maioria das cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* produz pigmento marrom quando cultivadas em meios de cultura com substratos fenólicos, enquanto para as outras espécies muitas vezes esse fenômeno não ocorre (CARFACHIA et al., 2006a). Tal característica constitui uma prova bioquímica útil na identificação das espécies de importância clínica, denominada fenoxidase, sendo realizada inclusive em alguns laboratórios de rotina (CAPOOR et al., 2007). Há pesquisas que demonstram a utilização desse recurso como forma de estabelecer a diferenciação de *C. neoformans* das outras espécies do gênero (CHEN et al., 2001; CARFACHIA et al., 2006a), contudo, existem outros estudos mostrando que isolados de *C. albidus*, *C. laurentii* e *C. uniguttulatus* podem apresentar produção de melanina, de

maneira menos pronunciada do que para *C. neoformans* e *C. gattii* (IKEDA et al., 2002; PEDROSO et al., 2009).

A quimiotipagem de *C. gattii* e *C. neoformans* é comumente realizada por intermédio do meio agar L-canavanina-glicina-azul de bromotimol (teste de CGB) (KWON-CHUNG; POLACHECK; BENNETT, 1982). Apenas *C. gattii* é resistente à canavanina, utilizando a glicina disponível no meio para seu crescimento e, no período de até cinco dias, mudam a cor verde original do meio para a cor azul (**figura 3-VI**). Já foram descritas, no entanto, cepas de *C. neoformans* com habilidade de resistir a elevadas concentrações de L-canavanina (NAKAMURA et al., 1998; KHAN et al., 2003). Com relação às outras espécies de *Cryptococcus*, o meio de CGB geralmente não é utilizado, entretanto, estudos conduzidos por Bauters et al. (2001) mostram que cepas clínicas de *C. laurentii* foram capazes de crescer na presença de L-canavanina e glicina.

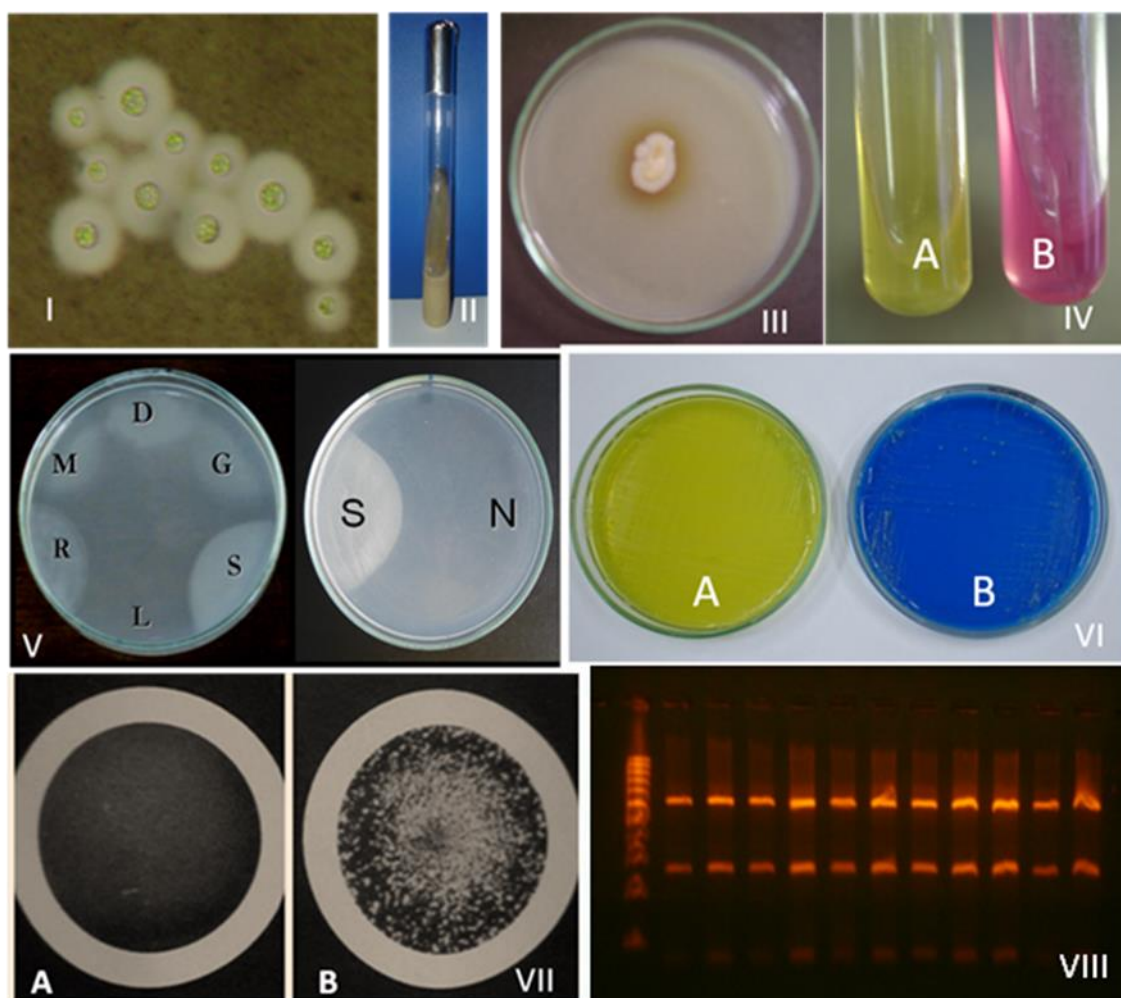


Figura 3. Métodos diagnósticos utilizados na identificação de *Cryptococcus* spp. I) *C. neoformans* no líquido contra-corado com Tinta da China 40X; II) Aspecto mucóide de *C. neoformans* em agar-Sabouraud 2% de glicose; III) Colônia de *C. neoformans* em meio Ágar

Semente de Niger com formação de melanina; IV) Uréia de Christensen. A - Teste negativo, A – Teste positivo; V) Auxonograma- Halos evidenciando crescimento fúngico; VI) Meio CGB: a) *C. neoformans* b) *C. gattii*; VII) Teste de Aglutinação em látex para detecção de antígeno; VIII); Gel de agarose 3% representativo de amplificação utilizando *primer* URA5 cortado com enzimas de restrição *Sau96I* e *HhaI* para identificação de *C. neoformans*. Fonte: Laboratório de Micologia Médica, 2010-2012.

As desvantagens apresentadas pelos testes fenotípicos relacionam-se principalmente com tempo de identificação e laboriosidade, além de ocorrer variabilidade de resultados em virtude da subjetividade de interpretação (WENGENACK; BINNICKER, 2009). Os métodos semiautomatizados e automatizados de identificação de leveduras como API 20C AUX e VITEK, permitem a obtenção de resultados em aproximadamente 72 horas. Muitas vezes, porém, apresentam limitações por dependerem de provas suplementares para completa identificação do isolado, como teste da urease e assimilação de outras fontes de carbono (GUNDES; GULENC; BRINGOL, 2001; MASSONET et al., 2004).

Outras opções para diagnóstico da criptococose são os ensaios de detecção de antígeno polissacarídicos capsulares, que apresentam elevada sensibilidade e rápidos resultados. Segundo Bivanco; Machado; Martins (2006) e Queiroz et al. (2008), o teste de aglutinação em partículas de látex sensibilizadas com anticorpos específicos (**Figura 3-VII**), representa uma ferramenta importante no diagnóstico da criptococose. Esta prova geralmente produz alta sensibilidade e especificidade, e consiste na detecção de polissacarídeos capsulares solubilizados nos fluidos corporais e que reagem com imunoglobulinas específicas de coelho conjugadas a partículas de látex. Em estudo desenvolvido com 96 pacientes, foi observado que o diagnóstico através da reação de aglutinação com partículas de látex mostrou positividade em 38 (97,4%) de 39 amostras, com um título variando de 1:2 a 1:32 (MOREIRA et al., 2006).

Pesquisas apontam que o uso de testes de aglutinação em látex para o acompanhamento da evolução do tratamento requer a utilização de kits originários de um único fabricante como o CALAS® “Cryptococcal Antigen Latex Agglutination System” (Meridian, Bioscience, Inc.), Pastorex Crypto Plus® (Diagnostics Pasteur) e Crypto-LA Test®- (Fumouze), uma vez que há diferenças na sensibilidade dos reagentes empregados. Além disso, a utilização desses testes para triagem, embora controverso, tem se justificado pelo número de casos com evolução para a criptococose após ocorrer aglutinação, sem qualquer achado em lâmina ou cultura (BIVANCO; MACHADO; MARTINS, 2006). Porém, reações falsopositivas podem ocorrer relacionadas ao fator reumatóide, presença de células de *Trichosporon* spp. e bacilos Gram-negativos na amostra, devendo, então, ser correlacionadas

com o quadro clínico e laboratorial do caso sob investigação (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008; HOUSTON; MODY, 2009).

Atualmente, apesar de não ser aplicado ao diagnóstico de rotina, existem métodos moleculares para detecção de sequências gênicas específicas de *C. neoformans* e *C. gattii* em espécimes clínicos ou com base na cultura (PASCHOAL et al., 2004; BOVERS et al., 2007). As ferramentas moleculares (**figura 3-VIII**) apresentam elevadas sensibilidade e especificidade de detecção, com potencial para resolver as limitações do diagnóstico convencional, podendo ser empregadas tanto na identificação como na tipagem e epidemiologia molecular do micro-organismo. No entanto, estes métodos requerem normalmente tecnologias mais sofisticadas, sendo também por este motivo mais dispendiosos, tornando-se limitados na rotina laboratorial a apenas alguns laboratórios de diagnóstico (CARVALHO et al. 2007; LUCAS et al. 2010).

Vários métodos moleculares baseados em PCR têm sido utilizados na caracterização e identificação de *Cryptococcus* spp., bem como em estudos epidemiológicos. Na PCR *fingerprinting*, são utilizados oligonucleotídeos iniciadores que são específicos para sequências microssatélites/minissatélites ou para sequências repetitivas hipervariáveis de *C. neoformans*, permitindo que os isolados sejam tipados com sensibilidade suficiente para detectar diferenças inter- e intra-variedades. Através desta técnica, foram identificados oito tipos moleculares [VN (VNI-VNIV) e VG (VGI-VGIV)] de *C. neoformans species complex*, diferenciados através do estudo de polimorfismos de regiões micro e minissatélites do DNA por amplificação das mesmas com primers como M13 e PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), baseado no gene *URA5*. Resultados indicam que os genótipos VNI e VNII correspondem ao sorotipo A, VNIII está relacionado ao sorotipo AD e VNIV ao sorotipo D de *C. neoformans*. Contudo, VGI-VGIV contêm isolados de dois sorotipos (B e C) de *C. gattii* (MEYER et al., 1999; MEYER et al., 2003; LATOUCHE et al., 2003; ESCANDON et al., 2006; DELIO et al., 2010).

De acordo com Tay et al. (2006) e Feng et al. (2008), o genótipo VNI é tem distribuição cosmopolita e são mais frequentemente isolados de pacientes com AIDS, enquanto que o VGI está associado a infecção em pacientes imunocompetentes e é considerado o genótipo mais frequente em países asiáticos. Com relação ao genótipo VGII, é bem distribuído na Oceania além do Norte e Sul americanos (Ellis et al., 2000; Kidd et al., 2004; Escandón et al., 2006; MacDougall et al., 2007). A maior parte dos isolados clínicos e ambientais do Sul, Sudeste e Centro-Oeste brasileiros são VNI, enquanto o VGII predomina nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, especialmente em jovens adultos imunocompetentes e

crianças (CASALI et al., 2003; IGREJA et al., 2004; MATSUMOTO et al., 2007; RIBEIRO et al., 2008; SANTOS et al., 2008).

Estudo realizado em 1996 comparou os perfis de amostras clínicas e ambientais de *C. gattii* provenientes dos Estados Unidos e da Austrália. Dos 48 isolados clínicos australianos, 44 (92%) pertenciam ao genótipo VGI, 3 (6%), ao VGII e 1 (2%), ao VGIII. Entre as 4 amostras clínicas americanas, 3 eram VGIII, e 1, VGII. Os isolados clínicos e ambientais australianos apresentaram certa correlação (SORRELL et al., 1996). Amostras de *C. neoformans* originadas dos diversos continentes não diferem muito, geneticamente. *C. gattii*, no entanto, apresenta padrão genético correlacionado com a origem geográfica. Há grande divergência entre os isolados australianos e americanos, estando as amostras africanas e asiáticas em posição intermediária (BOEKHOUT et al., 1997).

Em um estudo ibero-americano, Meyer e colaboradores (2003), analisando diversos isolados provenientes de vários países, mostraram que entre as amostras de *C. neoformans*, o genótipo VNI (68,1%) é o mais prevalente. Com relação às amostras de *C. gattii*, predominou o tipo molecular VGIII (44,9%). Casali et al. (2003), analisando 124 isolados (105 clínicos e 19 ambientais), verificaram que 93 amostras eram provenientes de pacientes portadores de AIDS. Entre os isolados ambientais, 52,6% eram VNI e 47,4%, VNIV. Entre os clínicos, 89,5% eram VNI e 10,5% eram VGIII, resultados estes que estão de acordo com o estudo anterior.

Já Escadón et al. (2006), obtiveram também como genótipo predominante VNI (62,9%), mas, entre os isolados de *C. gattii*, foi mais frequente VNII (99,2%). Ainda neste estudo, foi verificado grande similaridade genética entre os isolados clínicos e ambientais de genótipo VNI, o que corrobora a idéia de que a criptococose pode ser adquirida através de inalação do fungo presente no ambiente. Apesar disso, alguns tipos moleculares encontrados em amostras clínicas, não foram isolados do ambiente. Este fato sugere que em tais pacientes houve uma reativação de uma infecção adquirida em uma região diferente ou há nichos ecológicos ainda não bem estabelecidos.

Matsumoto et al. (2007) genotiparam 47 isolados clínicos provenientes de diversos locais do estado de São Paulo-Brasil, utilizando dois métodos: RAPD e *PCR fingerprinting*. Quando utilizada a técnica de *PCR fingerprinting*, observou-se certa homegeneidade entre as amostras. Foram formados dois grupos, um correspondente a VNI (95,7%), e outro, a VNII (4,3%). A análise a partir do RAPD revelou maior heterogeneidade, com presença de 14 perfis de RAPD e formação de 3 grupos principais: I (VNI), II(VNII) e III (VNIII), contendo, respectivamente, 41, 2, e 4 isolados. No Espírito Santo e Brasil, foram isoladas 10 amostras

ambientais, todas identificadas como VNI (RIBEIRO; NGAMSKULRUNGROJ, 2008). Estudo realizado no Pará, com amostras clínicas, encontrou predominância de VNI (50%), seguido de VGII (44%) e VGI (6%) (DOS SANTOS et al., 2008).

Trilles et al. (2008), trabalharam com 443 isolados brasileiros de *Cryptococcus* spp e apesar de levar em consideração dados de um número limitado de unidades federativas (11 estados brasileiros), esta pesquisa representa o perfil mais abrangente da epidemiologia molecular de *C. gattii* e *C. neoformans* no Brasil. Utilizando dados de diversos estudos anteriores juntamente com dados adicionais, obteve-se os seguintes resultados: o tipos moleculares mais comuns foram o VNI (64%) e o VGII (21%), seguidos de VNII (5%), VGIII (4%), VGI e VNIV (3% cada) e VNIII (<1%). Não foram identificadas amostras VGIV entre os isolados brasileiros. Segundo os autores, *C. gattii* ocorre predominantemente no nordeste e *C. neoformans*, em sua maior parte, no sudeste. Foi sugerido, ainda, que o tipo molecular VGI teria uma tendência de ocorrer em locais de latitude mais elevada.

Em um artigo recente, Délio e colaboradores (2010) identificaram molecularmente 81 isolados de *Cryptococcus* obtidos de LCR de 77 pacientes com diagnóstico de meningite criptocócica entre os anos de 1998 e 2007 em Uberaba, Minas Gerais, Brasil. Dos 77 pacientes, 57 (74%) eram do sexo masculino com média de idade de 35,6 anos. Setenta e dois isolados (88,9%) foram de 68 pacientes com AIDS e criptococose foi a doença primária em 38 (55,9%) dos pacientes. A micose e a AIDS foram diagnosticadas simultaneamente em 25 (65,8%) destes 38 pacientes. De acordo com os autores, os genótipos foram caracterizados através da utilização do *primer* URA5 e a variabilidade genética foi determinada utilizando PCR-fingerprinting com o *primer* de minissatélite específico - M13. Setenta e seis dos 81 isolados foram *Cryptococcus neoformans* (93,8%), enquanto o restante foi identificado como *C. gattii* (6,1%). Isolados de *C. neoformans* foram genótipo VNI (sorotipo A), enquanto os isolados *C. gattii* foram VGII. Seis dos nove isolados de pacientes sem AIDS foram VNI. Segundo os autores, a ocorrência de VGII em Minas Gerais indica uma expansão geográfica no Brasil.

Da mesma forma, para um diagnóstico de criptococose preciso e completo, é importante adicionar aos testes de rotina, a realização do perfil de sensibilidade antifúngica de *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. gattii*. Este método é muito utilizado para fins epidemiológicos e para instituir o tratamento adequado ou acompanhamento da resposta terapêutica (QUEIROZ et al., 2008).

2.5 Terapia na Criptococose e Teste de sensibilidade a antifúngicos

O tratamento de enfermidades causadas por fungos é um desafio, uma vez que existem muitas similaridades entre a maquinaria celular de fungos e a humana, diminuindo-se, desta forma, a disponibilidade de fármacos para o tratamento destas doenças, quando comparadas a doenças de etiologia bacteriana ou viral (IDNUM et al., 2005).

Atualmente, os antimicóticos disponíveis constituem um pequeno grupo de fármacos distribuídos entre poliênos, azólicos e alilaminas, que não atingem os resultados esperados (WALSH et al, 2000; WEIG et al, 2001; NUCCI; MARR, 2005).

Segundo File (2000), esta vertente na pesquisa de novos compostos com ação antifúngica tem levado a comunidade científica a investigar a corrida medicamento *versus* micro-organismos. Desde o início dos anos 80, o número de fármacos em fase de desenvolvimento diminuiu consideravelmente enquanto que a resistência dos patógenos aos mesmos tem crescido, porque estes estão cada vez mais desenvolvendo uma série de novos mecanismos de resistência.

De acordo com Kanafani; Perfect (2008), apesar dos avanços nas intervenções preventivas, diagnósticas e terapêuticas, infecções fúngicas invasivas causam significativa morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos. O espectro de patógenos, agentes de infecções fúngicas, em imunodeprimidos está crescendo, no entanto, as opções terapêuticas disponíveis são limitadas, e dentro deste contexto, o aumento da resistência antifúngica está se tornando problema de saúde pública.

De acordo com Zanini et al. (2001) e Bianic; Harrison (2004), os principais fármacos citados para o tratamento da criptococose são anfotericina B, associada ou não a 5-flucitosina, devido a sua toxicidade principalmente renal, e fluconazol, podendo ser administrados via endovenosa e/ou oral. Segundo os autores, há relatos de tratamento de criptococose cutânea (primária e secundária), com fluconazol inicialmente endovenoso (200 mg a cada 12 h por 14 dias) e após manutenção com a fármaco via oral (400 mg/dia) por no mínimo 45 dias com cura das lesões.

No caso da criptococose pulmonar ou disseminada com comprometimento do SNC, a anfotericina B é administrada na dose equivalente a 0,7-1 mg/kg/dia, início com 5 mg/dia, com diminuição progressiva até 0,5 a 1-2 mg/dia associada ou não com 5-fluocitosina (100-150mg/kg/dia) via oral ou endovenoso, por duas a três semanas, seguido pela consolidação da terapia com fluconazol (200-400 mg/dia via oral ou endovenosa) por 10 a 12 semanas e manutenção com o mesmo fármaco (200 mg/dia via oral). Outros antifúngicos como o

itraconazol também é citado como alternativa para o tratamento da criptococose, porém em menor frequência (BIVANCO; MACHADO; MARTINS, 2006).

Filippin; Souza (2006) e Luisi et al. (2008) afirmam que a anfotericina B é um poliêno produzido naturalmente pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus*, sendo inicialmente obtida em meados de 1955 (VANDEPUTTE et al., 1956). No final dos anos 1950, a anfotericina B era utilizada em alguns casos clínicos e em 1965 foi o primeiro agente antifúngico a ser aprovado pela “U.S. Food and Drug Administration” (FDA) (WU, 1994; DISMUKES, 2000).

Este fármaco é um dos antifúngicos mais antigos e considerado o fármaco de referência para o tratamento da maioria das infecções fúngicas mesmo com elevada toxicidade e a introdução de antimicóticos azólicos sistêmicos na década de 1980. Seu efeito antifúngico se dá mediante a interação direta com o ergosterol da membrana celular fúngica não interferindo na síntese da membrana, mas sim desestabilizando e facilitando a formação de fendas que permitem a perda de íons e componentes celulares (DISMUKES, 2000; FICA, 2004). O ergosterol é necessário na manutenção da permeabilidade e fluidez da membrana, garantindo a modulação de enzimas ligadas à membrana plasmática. A ausência do ergosterol e o acúmulo de seus precursores afetam a estrutura da membrana e a absorção de nutrientes, tornando os fungos vulneráveis a danos (HUANG et al., 2002).

O tratamento com anfotericina B quase sempre resulta em algum grau de disfunção renal, que varia em gravidade de um paciente para o outro, sendo claramente uma função da dose total. Em um estudo utilizando anfotericina B, 24,8% dos pacientes tratados com 0,6-1,0 mg/Kg/dia, apresentaram nefrotoxicidade comprovada através de achados laboratoriais (MORA-DUARTE et al., 2002).

Um estudo com células renais de ratos conduzido por Varlam et al. (2001), sugeriu que a anfotericina B induzia apoptose das células tubulares renais e células intersticiais em uma taxa diretamente proporcional a sua concentração. Observou-se 90% de apoptose e necrose com a concentração máxima utilizada de 5,0 mg/mL, reduzindo-se as lesões à medida que esta era proporcionalmente diminuída. Estudos posteriores demonstraram que o efeito tóxico foi máximo nos túbulos com hipocalemia, hipostenúria e diminuição da capacidade de excretar ácidos, como também envolveu os glomérulos com diminuição da depuração da creatinina com o sem azotemia (MORA-DUARTE et al., 2002; FILIPPIN; SOUZA, 2006).

Barchiesi et al. (2004) ao analisar a eficácia terapêutica da anfotericina B durante criptococose experimental, verificou que camundongos CD1 machos infectados com $2,5 \times 10^3$ UFC via endovenosa apresentam redução das contagens fúngicas em todos os órgãos analisados a exceção do cérebro. Os animais foram tratados com 0,3 mg/Kg/dia de

anfotericina B intraperitonealmente durante 10 dias consecutivos. No cérebro decorrido 21 dias após o fim da terapia não foi evidenciado nenhuma diferença nas contagens fúngicas entre o grupo tratado e o controle.

Por outro lado, Larsen et al. (2004) realizaram estudo com o intuito de delinear a dose da anfotericina B na qual se obtinha melhor resultado aliado a menor toxicidade durante infecção em camundongos Balb/c machos infectados com 700 UFC de *C. neoformans* intracerebralmente. As doses utilizadas variaram de 0,3 a 1,3 mg/Kg/dia administradas via endovenosa. Foi observado que 95% dos animais tratados com 0,5 mg/Kg/dia de anfotericina B sobreviveram até o final do experimento (16 dias). É importante observar que com doses iguais ou superiores a 0,7 mg/Kg/dia foi verificado número inaceitável de morte nas primeiras 24 horas (cerca de 40%), sendo o percentual de mortes diretamente proporcional ao aumento da dose.

Apesar dos efeitos tóxicos demonstrados em pesquisas anteriores, o tratamento com anfotericina B pura ou conjugada a fluocitosina e fluconazol, é geralmente bem sucedido na criptococose, porém falhas na terapia ocorrem por diversas razões, incluindo resistência direta aos antifúngicos (PEREA;PATTERSON, 2002).

Achados de resistência antifúngica *in vitro* em cepas clínicas e ambientais de *Cryptococcus*, embora raros, são relatados (COSTA et al., 2009). Alguns estudos descrevem tal fenômeno em cepas clínicas de *C. neoformans* para fluconazol, anfotericina B e voriconazol, bem como em isolados de *C. gattii* para itraconazol, flucitosina e fluconazol (CHANDENIER et al., 2004; ALMEIDA et al., 2007; SOARES et al., 2008). Em amostras ambientais de *C. neoformans*, a resistência antifúngica primária já foi detectada para itraconazol e fluconazol (SOARES et al. 2005; PEDROSO et al., 2006).

Com relação a outras espécies de *Cryptococcus*, estudos demonstrando o perfil de sensibilidade antifúngica *in vitro* são escassos, entretanto, em uma pesquisa realizada com isolados ambientais de *C. neoformans* var. *neoformans* (n=16), *C. albidus* (n=17), *C. laurentii* (n=14) e *C. uniguttulatus* (n=3) frente a anfotericina B, fluconazol, flucitosina e itraconazol, parte das cepas analisadas mostrou perfil de resistência aos fármacos testados com MICs variando de 0,125 a 2 µg/mL para anfotericina B; 0,06 a 8 µg/ mL para itraconazol, 0,5 a 64 µg/mL para fluconazol e 5-fluorocytosina. (PEDROSO et al., 2006).

Desenvolvimento de resistência de isolados de *Cryptococcus* a anfotericina B também foram descritos por Lozano-Chiu et al. (1998); Cuenca-Estrella et al. (2001); Sar et al. (2004) os quais apontam o aparecimento espécies de *Cryptococcus* resistentes a anfotericina B associado a casos de resistência aos azoles, particularmente quando há resistência cruzada a

outros triazoles e intolerância aos seus componentes, o que caracteriza grave problema para a sobrevivência dos pacientes afetados pela criptococose.

Outro estudo mostrando a ação da anfotericina B sobre isolados mutantes propôs que a resistência ocorria por mudanças tanto qualitativas quanto quantitativas dos esteróis, podendo ocorrer uma diminuição do conteúdo de ergosterol celular ou substituição de alguns ou de todos por outros com afinidade diminuída a anfotericina. O ergosterol, colesterol e estigmasterol podem ser substituídos por esterol 3-hidroxi ou 3-oxi ou também pode ocorrer reorientação ou mascaramento do ergosterol existente, tornando a ligação da anfotericina termodinamicamente menos favorecida (PEREA; PATTERSON, 2002).

Filippin (2006) observaram resistência de dois isolados de *Cryptococcus neoformans* a anfotericina B associada à padrão de esteróis. Segundo o autor, os isolados resistentes possuíam um defeito na esterol isomerase, levando ao acúmulo de outros esteróis e diminuição do conteúdo de ergosteróis.

Para o monitoramento do desenvolvimento de resistência por parte de isolados de *Cryptococcus* spp aos fármacos disponíveis, bem como o acompanhamento da resposta terapêutica, faz-se necessária a utilização dos testes de susceptibilidade. Embora a susceptibilidade de leveduras aos antifúngicos disponíveis seja variável e previsível, nem sempre uma determinada amostra isolada segue o padrão geral. (CUENCA-ESTRELLA; RODRIGUEZ-TUDELA, 2002; PFALLER, 2012).

Segundo Barchiesi et al. (2000), a avaliação da susceptibilidade de leveduras do gênero *Cryptococcus* aos antifúngicos é de grande interesse considerando a alta frequência em pacientes imunocomprometidos e as severas manifestações clínicas da infecção por esta levedura.

A utilização de vários métodos pode conferir resultados diferentes (NORRIS et al., 1999; JESSUP et al., 2000; FERNÁNDEZ-TORRES et al., 2002; GHANNOUM et al., 2006) e a importância da padronização reflete em terapêutica eficaz, a qual é dependente da correta escolha do fármaco que apresente atividade em relação ao fungo em questão (BARROS, SANTOS; HAMDAN, 2006). Os métodos padronizados de reconhecimento nacional e internacional para leveduras e fungos filamentosos têm contribuído para prever não somente o tipo de antifúngico adequado, como também a concentração do fármaco para a terapêutica instituída (REX et al., 2001; PFALLER et al., 2008; PFALLER, 2012).

Inicialmente, para leveduras, foi proposto o documento M27-A em 1997, com segunda edição aprovada em 2002 (M27-A2) e a terceira e atual em 2008 (M27-A3), todos pertencentes ao Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), antigo National

Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (CUENCA-ESTRELLA et al., 2002). O documento é composto por protocolo padronizado para avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de levedura que causam infecções invasivas, incluindo *Cryptococcus neoformans*. O documento inclui a seleção de agentes antifúngicos, preparação de soluções-padrão e diluições de antifúngicos utilizadas para realização, implementação e interpretação dos testes. Além disso, esta padronização está relacionada com os meios de cultura utilizados para crescimento do fungo e para o teste de susceptibilidade (RPMI-1640), determinação da concentração inibitória mínima (CIM), padronização do inóculo, temperatura de incubação, leitura e interpretação dos resultados (CLSI, 2008).

De acordo com Brandt et al. (2001), vários estudos utilizando a metodologia do CLSI foram realizados para avaliar a situação da resistência a *Cryptococcus*. Em um estudo realizado nos Estados Unidos com 732 isolados clínicos obtidos nos períodos de 1992 a 1994 e 1996 a 1998, dois isolados mostraram CIMs elevadas para a anfotericina B ($\geq 2 \mu\text{g/mL}$), 14 isolados a fluocitosina ($\geq 32 \mu\text{g/mL}$), 8 isolados a fluconazol ($\geq 64 \mu\text{g/mL}$) e 45 isolados a itraconazol ($\geq 1 \mu\text{g/mL}$).

Souza et al. (2005) verificaram a atividade antifúngica de anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol em 70 amostras de *Cryptococcus neoformans* (66 identificados como *C. neoformans* var. *neoformans* e 4 como *C. neoformans* var. *gattii*) isoladas de líquido céfalo raquidiano (LCR) de pacientes com AIDS e em 40 amostras de *C. neoformans* obtidas do meio ambiente. A metodologia empregada para o teste de susceptibilidade foi o da microdiluição em caldo proposto pelo NCCLS M27-A2. As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para os isolados clínicos variaram de 0,06-1,0 $\mu\text{g/mL}$ para anfotericina B, 0,125-8 $\mu\text{g/mL}$ para fluconazol, 0,03-0,5 $\mu\text{g/mL}$ para itraconazol e 0,03-0,25 $\mu\text{g/mL}$ para voriconazol, enquanto que para as amostras ambientais de *C. neoformans* as concentrações inibitórias variaram de 0,015-0,125 $\mu\text{g/mL}$, 0,25-2,0 $\mu\text{g/mL}$, 0,007-0,125 $\mu\text{g/mL}$ e 0,03-0,25 $\mu\text{g/mL}$ para anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol, respectivamente. Os resultados evidenciaram que as CIMs dos isolados clínicos tendem a ser maiores que a dos isolados ambientais. Contudo, as amostras testadas não apresentaram perfil de resistência, levando-se em consideração a metodologia e critério de interpretação estudados.

Oliveira et al. (2010), trabalharam com três agentes antifúngicos: anfotericina B e fluconazol, ambos utilizados no tratamento da criptococose; e Ciclopirox olamina, um agente antifúngico utilizado atualmente para infecções superficiais. Os autores observaram CIMs variando de 0,03 a 1 $\mu\text{g/mL}$ para anfotericina B; 2-32 $\mu\text{g/mL}$ para fluconazol; e 0,25 a 1 $\mu\text{g/mL}$ para a ciclopirox olamina. Com relação à concentração fungicida mínima (MFC), os

isolados apresentaram MFCs variando de 0.03-2 µg/mL para anfotericina B e 0.5- 4 µg/mL para Ciclopirox olamina. De acordo com os autores, ciclopirox olamina representa uma alternativa em potencial para o tratamento da criptococose sistêmica.

Em vista da resistência verificada e tomando por base que tratamentos prolongados geram efeitos tóxicos ao organismo, visto que os antifúngicos também agem sobre outras células eucarióticas como as somáticas, é indispensável o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para aumentar a disponibilidade de fármacos com ação antifúngica mais efetivas e menos tóxicas, contribuindo assim para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes (OLIVEIRA et al. 2010).

2.6 Ciclopirox olamina

De acordo com Niewerth et al. (2003), ciclopirox olamina (originalmente HOE 296) teve seu primeiro relato como agente antifúngico em 1973. Este fármaco é utilizado no tratamento de micoses superficiais ou candidíase vaginal e está disponível em diferentes formulações farmacêuticas como gel, solução, creme, shampoo e esmalte terapêutico, sendo administrado topicamente (JUE et al., 1985; GUPTA, 2001a,b; STAROVA; ALY, 2005; GUPTA, 2005c; GUPTA et al., 2005; ROSEN; LINGAPPAN, 2006).

A Ciclopirox olamina (CPO), conhecida quimicamente por 2-aminoetanol sal do 6-ciclohexil-1-hidroxi-4-metil-2-piridona (**Figura 4**), é um dos fármacos da classe das hidroxipiridonas juntamente com octopirox (piroctona) olamina e rilopirox. Trata-se de um produto sintético com peso molecular de 268, 35 g/mol (U.S. PHARMACOPÉIA) e que apresenta forma cristalina branco-amarelada com ponto de fusão característico entre 140 e 145°C, pKa de 7.2 e Log de P de 3.42 (NOGUEIRAS-NETO et al., 2012).

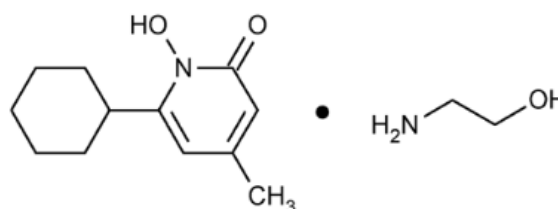


Figura 4. Fórmula estrutural da 2-aminoetanol sal do 6-ciclohexil-1-hidroxi-4-metil-2-piridona

De acordo com Jones, 2003, os ensaios clínicos com a ciclopirox olamina iniciaram em 1980 e permanecem em desenvolvimento. Atualmente, pesquisas com o fármaco estão

concentradas no tratamento de infecções fúngicas da pele e candidíase vaginal, onde está bem estabelecido nestas indicações.

Segundo Niewerth et al. (2003); Walsh et al. (2006), este fármaco é um agente fungicida com amplo espectro de ação antimicrobiana e anti-inflamatória, demonstrando excelente atividade fungicida contra fungos de interesse médico como dermatófitos e leveduras, incluindo aquelas frequentemente azol-resistentes como *Candida glabrata*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*. Além disso, o fármaco também apresenta amplo espectro de ação contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, além de atuar em tumores malignos de origem hematológica (WEIR et al., 2011).

Gupta (2001b) e Gupta; Plott (2004) afirmam que a atividade antiinflamatória inerente a ciclopirox olamina representa um fator importante nas infecções fúngicas, uma vez que estas podem ser complicadas na presença de processos inflamatórios.

Ciclopirox olamina pode ser fungistático ou fungicida e dentre as espécies de dermatófitos que são inibidas pelo ciclopirox, destacam-se *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* e *T. rubrum*. Entre as leveduras, destacam-se espécies de *Malassezia* como *M. restricta*, *M. globosa* e *M. furfur* e espécies de *Candida* como *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*. Além destes, pode atuar também contra fungos dimórficos (*Blastomyces dermatitidis* e *Histoplasma capsulatum*), e vários outros, incluindo espécies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Phialophora* e *Fusarium*. (NIEWERTH et al., 2003; WALASH et al., 2006; Zhang et al., 2007).

Hannel et al. (1988) demonstraram a ação fungicida de ciclopirox olamina em quatro isolados de *Cryptococcus neoformans* que apresentaram CIM de 6 µg/mL. Contudo, o método utilizado não foi padronizado, com número de isolados insuficiente para avaliação da ação antifúngica do fármaco.

Para a maioria dos dermatófitos e leveduras, a concentração mínima fungicida se encontra dentro da faixa de 0,9 a 3,9 µg/mL quando estes micro-organismos estão cultivados em meio ágar Sabouraud-dextrose (ABRAMS et al., 1992).

Contudo, Soares-Cury (2001) avaliando a atividade *in vitro* de antifúngicos e anti-sépticos frente a dermatófitos isolados de amostras clínicas de pacientes com *tinea pedis*, constataram que para a CPO a CIM variou de 8 µg/mL a 32 µg/mL. No entanto, a maioria das cepas de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* e dois isolados de *E. floccosum* foram inibidas na concentração de 16 µg/mL. A CMF em relação ao *T. mentagrophytes* foi observada nas concentrações de até 64 µg/mL.

Gupta; Kholi (2003) testando a atividade antifúngica *in vitro* de ciclopirox olamina contra dermatófitos e outros fungos filamentosos, verificaram a excelente atividade do fármaco isolado e quando associado à terbinafina, cetoconazol e itraconazol. A concentração mínima inibitória da ciclopirox olamina ficou entre 0,015µg/mL e 0,125 µg/mL para dermatófitos e 0,03 µg/mL a 8 µg/mL para os outros fungos.

Oliveira e colaboradores em 2010, demonstraram pela primeira vez excelente atividade antifúngica da CPO frente isolados de *Cryptococcus* obtidos de Líquido cefalorraquidiano de pacientes com AIDS, usando anfotericina B e fluconazol como controles. A metodologia empregada foi a mais recente publicada através do documento M27-A3 do CLSI (2008). Como resultados, os autores observaram que as CIMs da CPO *in vitro* foram tão eficazes quanto as da anfotericina B, fármaco de escolha para o tratamento da criptococose. As concentrações variaram de 0,25 a 1 µg/mL para CPO e de 0,03 a 1 para a anfotericina B. Com relação à atividade fungicida, CPO apresentou MFCs mais elevados, com concentrações variando de 0.5 a 4 µg/mL contra 0.03 a 2 µg/mL da anfotericina B. Os autores indicam a CPO como alvo em potencial para tratamento de micoses sistêmicas.

Desde que ciclopirox foi introduzido na terapêutica clínica, há mais de 20 anos, vários estudos enfocando o mecanismo de ação do fármaco foram publicados. Segundo Gupta (2001), quando sua utilização tornou-se mais frequente, os resultados de várias investigações e comparações da sua eficácia com outros agentes antimicrobianos foram relatados.

Iwata; Yamaguchi (1981); Urbani et al. (1995), Gupta (2001) e Jones 2003 descreveram que diferentemente da maioria dos agentes antifúngicos, a ciclopirox olamina não exerce efeitos sobre a biossíntese do esterol e seu mecanismos de ação é complexo, interferindo em vários processos metabólicos da célula fúngica.

Pesquisas realizadas por Abrams et al. (1992); Gupta (2001) e Niewerth et al. (2003), demonstraram que o mecanismo de ação do fármaco consiste na interferência na recaptação e acumulação de precursores da síntese de macromoléculas da célula fúngica como aminoácidos ou na absorção de íons essenciais como potássio e fosfato, além de causar inibição da biossíntese de ácido ribonucleico (RNA) e ácido desoxirribonucleico (DNA) destes micro-organismos.

Além desses mecanismos, Bohr; Kraemer (2000); Gupta (2001); Kokjohn et al. (2003) e Jones (2003) descrevem que ciclopirox olamina atua na quelatação de metais trivalentes como o Fe^{3+} , por quem tem alta afinidade. Este mecanismo inibe enzimas dependentes de metal como catalase e peroxidase, as quais são importantes na degradação de peróxidos tóxicos e, consequentemente, contribuem para a integridade da célula fúngica. Segundo Jones (2003),

este mecanismo único contribui para um potencial muito baixo no desenvolvimento de mecanismos de resistência fúngica.

Segundo Niewerth et al. (2003), a CIM de ciclopirox aumenta efetivamente quando são usados meios contendo tioglicolato. Os sais de ferro presentes nesse meio antagonizam o efeito inibitório pela formação de complexos com o antifúngico.

Com base nos estudos de Bohr; Kramer (2000), a complexidade do mecanismo de ação da ciclopirox olamina pode gerar uma diminuição na ocorrência de resistência, quando comparado a outros agentes antifúngicos. Comprovando esta afirmação, verifica-se que mesmo após ser introduzido na terapia clínica há mais de 20 anos, ainda não foi constatado resistência fúngica (NIEWERTH et al., 2003).

Com relação à segurança do fármaco, pesquisas confirmam que os efeitos adversos são raros e limitam-se a reações locais após aplicação tópica. A toxicidade do fármaco foi testada em vários modelos animais, assim como a sua carcinogenicidade e mutagenicidade, para os quais não foi demonstrada potencialidade em nenhum dos efeitos testados. Contudo, a CPO apresenta baixa biodisponibilidade e tempo de meia vida curto, o que justifica a importância da nanotecnologia terapêutica para superar as desvantagens do fármaco e, ao mesmo tempo, possibilitar a sua aplicação *in vivo* (ALPERMANN; SCHUTZ, 1981; COPPI; SILINGARDI, 1992; GUPTA; SKINNER, 2003).

2.7 Nanotecnologia Farmacêutica

A nanotecnologia é um campo científico multidisciplinar que tem experimentado um incremento notório nas últimas décadas, encontrando aplicações em diversas áreas, principalmente na indústria farmacêutica através do desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos mais eficazes e seguros para o tratamento de várias doenças, incluindo as de origem microbiana (DURÁN et al., 2006; SAKATA et al., 2007; STEENWINKEL et al. 2007; OLSON et al., 2010; YOSHIZAWA et al., 2011).

A nanotecnologia farmacêutica baseia-se na utilização de substâncias bioativas em escala nanométrica ou micrométrica que apresentam propriedades físico-químicas e comportamentais diferenciadas associadas à modificação da liberação de fármacos a partir de formas farmacêuticas (DAS; DAS, 2003). Após estudo aprofundado sobre os impactos comerciais desta tecnologia, estima-se que em 2015 metade do setor farmacêutico dependerá da nanotecnologia, com mercado mundial em torno de U\$\$ 1 trilhão. Dentre os países que mais investem nesta área estão os Estados Unidos e o Japão, porém o Brasil tem realizado

investimentos significativos nos últimos anos em redes de pesquisa e projetos na área (Ministério de Ciência e Tecnologia, Brasil. “Relatório nanotecnologia: investimentos, resultados e demandas”, 2006).

2.7.1 Sistemas de liberação de fármacos

Os fármacos não encapsulados apresentam diversas desvantagens que costumam impedir a sua utilização, tais como rápida metabolização no organismo e seus efeitos tóxicos decorrentes de sua baixa solubilidade plasmática, bem como sua ação indiscriminada sobre células sadias. Além disso, um fármaco de efeito sistêmico deve permanecer na circulação o tempo necessário para seu efeito terapêutico, dentro de uma faixa segura de alta eficácia combinada à baixa toxicidade, e um mínimo de doses repetitivas (STEENWINKEL et al., 2007).

Diante dessa problemática, os sistemas de liberação de fármacos representam um dos setores da nanotecnologia com maior potencial de aplicação. Isto se deve ao fato de que o desenvolvimento de novas moléculas ativas gera alto custo, o que torna os sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos uma das áreas da indústria farmacêutica mais promissoras por resgatar fármacos eficazes, que foram descartados após descoberta de potenciais efeitos colaterais ou baixa biodisponibilidade, além de gerar novas patentes. Além de proteger o fármaco contra a degradação prematura e promover sua solubilização, a encapsulação de um fármaco em nanossistemas apropriados pode melhorar sua cinética e biodistribuição, bem como direcionar o fármaco para o seu tecido ou célula-alvo (SHAFFER, 2005; KHAN et al., 2005).

Esses sistemas são capazes de modificar a distribuição do princípio ativo nos sistemas biológicos, e portanto, podem ser usados para melhorar a eficácia terapêutica e reduzir os efeitos tóxicos. Dentre as vantagens que estes sistemas oferecem quando comparados a outros de dosagem convencional, podemos citar: 1) maior controle da liberação do princípio ativo, diminuindo o aparecimento de concentrações tóxicas e subterapêuticas; 2) utilização de menor quantidade do princípio ativo 3) maior intervalo entre as doses, resultando na diminuição do número de doses; 4) possibilidade de oferecer mais de um agente terapêutico simultaneamente (terapia de combinação) 5) Direcionamento do fármaco para sítios específicos 6) melhor aceitação do tratamento pelo paciente (PEER et al., 2007; DAVIS; CHEN; SHIN, 2008; ZHANG et al., 2008; OLSON et al., 2010). Além disso, as formulações na escala nanométrica podem penetrar na célula hospedeira, através da endocitose, e liberar o agente antimicrobiano diretamente nos parasitas intracelulares (WAGNER et al., 2006; ZHANG et al., 2008).

Os lipossomas estão entre os principais exemplos de sistemas nanoestruturados para encapsulação de fármacos e vacinas. Trata-se de vesículas esféricas de tamanho variável (em escala de nm e μm) composta de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, contendo em seu interior um meio aquoso (TORCHILIN, 2005; ZHANG; GRANICK, 2006). Foram descobertos na década de 60 por Alec Bangham e colaboradores durante um estudo onde verificou que alguns fosfolipídios quando entram em contato com a água formam imediatamente uma esfera de bicamada (BANGHAM, 1961). Porém, a investigação quanto à capacidade de encapsulação de fármacos e a proposta de utilização de lipossomas como sistema transportador de fármaco para controlar a liberação surgiu na década de 70 com o pesquisador Gregory Gregoriadis, sendo desde então extensivamente estudados (NEW; CHANCE; HEATH, 1981; FRÉZARD et al., 2005).

Estas vesículas são constituídas basicamente por fosfolipídeos e esteróis. Entre fosfolipídeos mais utilizados nas formulações lipossomais está a fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e esfingomielina, que tendem a formar uma bicamada estável em solução aquosa, sendo as fosfatidilcolinas as mais empregadas nas preparações lipossomais. Os fosfolipídeos são os principais componentes das membranas celulares apresentando a capacidade de auto-organização quando em soluções, portanto os lipossomas são compostos por uma porção hidrofílica (cavidade interna aquosa) e outra hidrofóbica (bicamada lipídica) (**Figura 5**). Os fármacos hidrossolúveis ficam encapsulados no interior da cavidade aquosa enquanto que os fármacos lipossolúveis são incorporados na bicamada lipídica (BATISTA et al., 2007).

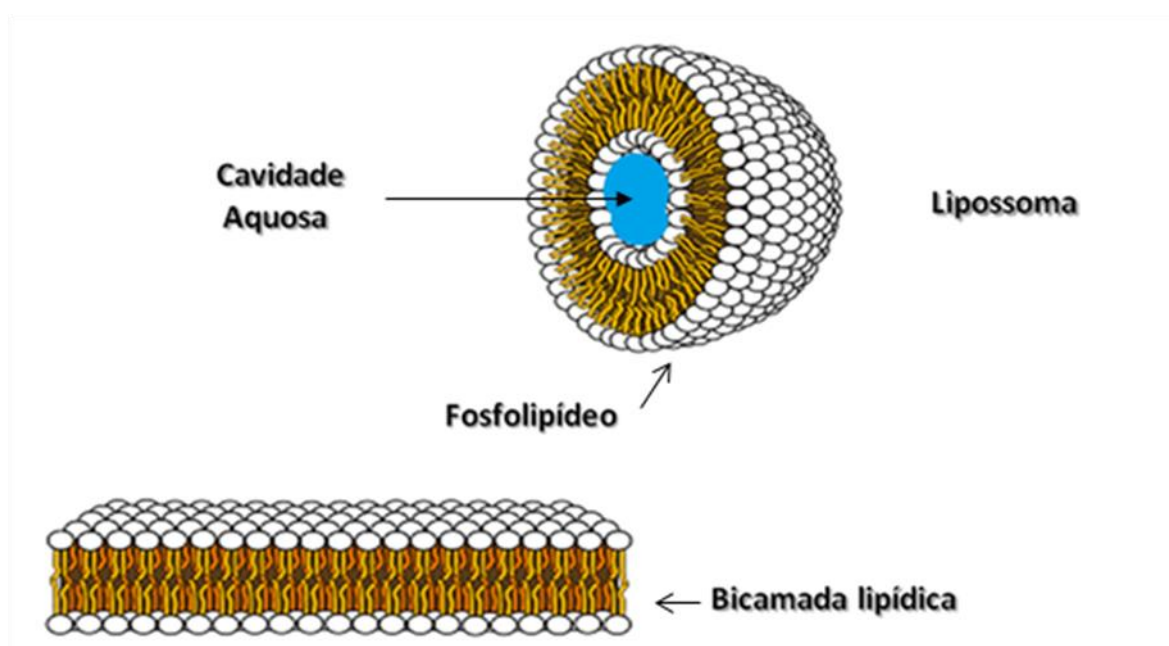


Figura 5. Estrutura do lipossoma e da bicamada lipídica (Adaptado de Chorilli et al., 2004).

Atualmente, os lipossomas são os mais utilizados nos sistemas de liberação de fármacos antimicrobianos. Uma das características distintivas dos lipossomas é a sua estrutura de bicamada lipídica, que mimetiza as membranas celulares e pode fundir-se facilmente com outras bicamadas lipídicas como a membrana celular dos agentes infecciosos (bactérias e fungos), liberando o composto ativo no meio intracelular (ZHANG et al., 2010).

Quanto à composição química e sua interação com o meio biológico, os lipossomas podem ser classificados em convencionais, furtivos ou Stealth, sítio-específicos e catiônicos (**Figura 6**).

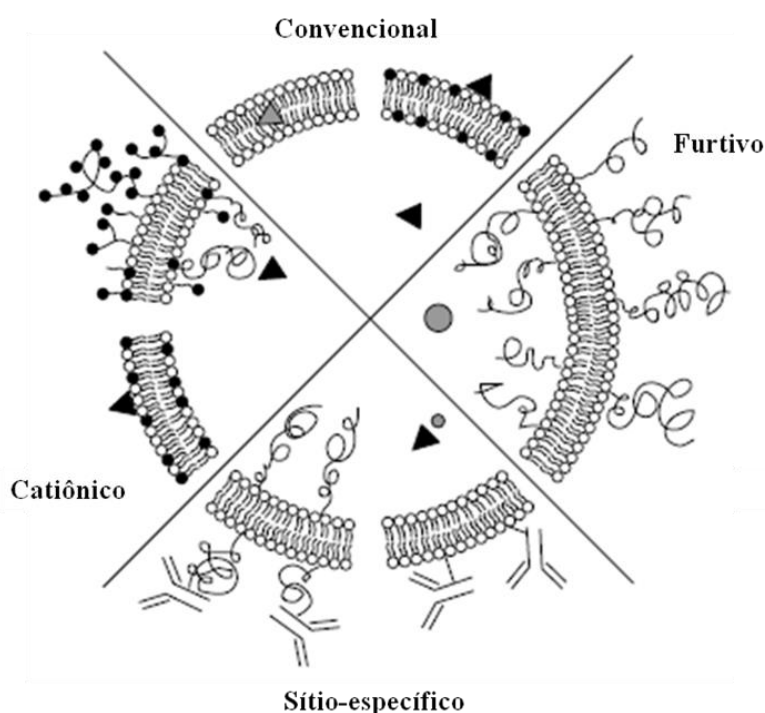


Figura 6- Características estruturais de lipossomas convencionais, furtivos, sítio-específicos e catiônicos (Adaptado de LASIC, 1996).

De acordo com Pinto-Alphandary et al. (2000) e Batista et al. (2007), os lipossomas convencionais são constituídos de fosfolípeidos e colesterol, além de um lípideo com carga negativa ou positiva para evitar a agregação das vesículas. A camada hidrofóbica destes lipossomas *in vivo* é responsável pelo rápido reconhecimento pelo sistema fagocitário mononuclear e consequentemente rápida remoção da circulação resultando em curta permanência na corrente sanguínea.

Já os lipossomas furtivos, também chamados de Stealth, ao contrário dos convencionais, apresentam longa permanência na corrente sanguínea. No desenvolvimento destes lipossomas são utilizados polímeros hidrofílicos naturais ou sintéticos como os polietilenoglicóis (PEG), Poli (óxido de etileno) (PEO) e óxido de propileno (TORCHILIN, 2005; DEHVARI; LIN, 2012). A presença de grupos inertes na superfície dos lipossomas reduz as interações com macromoléculas e desta forma estabilizam estas vesículas. A estabilidade biológica e coloidal dos lipossomas foi drasticamente aumentada pelo seu revestimento com polímeros hidrofílicos inertes, impedindo a penetração e adsorção de opsoninas e promovendo um baixo reconhecimento dos lipossomas pela células do sistema retículo endotelial (ABU LILA et al., 2009; LI et al., 2009).

Na tentativa de direcionar e aumentar a especificidade da interação dos lipossomas com as células alvo foram desenvolvidos lipossomas sítios-específicos, aos quais são adicionados em sua superfície, por ligação covalente, ligantes de reconhecimento como anticorpos monoclonais e oligossacarídeos, os quais conferem seletividade para liberar o fármaco no sítio de ação desejado, evitando com isso a ação tóxica do fármaco sobre as células adjacentes (BATISTA et al., 2007).

Sharma e Sharma (1997) afirmam que a instabilidade física e química das formulações lipossomais pode ocasionar um baixo tempo de meia vida. O estudo da estabilidade dos lipossomas deve incluir a caracterização do produto final. Outros fatores que devem ser levados em consideração são: pH, estado de tamponamento e força iônica. Segundo Edwards; Baeumner (2006), temperatura, luz, calor e oxigênio são fatores do meio ambiente que exercem influência na estabilidade. Tais fatores podem induzir alterações na distribuição de tamanho das vesículas, oxidação e hidrólise dos lipídeos.

Samuni e colaboradores (2000) afirmam que a degradação oxidativa dos lipídios em geral pode ser minimizada pela proteção das preparações lipídicas da exposição à luz; pelo armazenamento em baixas temperaturas, pela adição de antioxidantes como o alfa-tocoferol ou butil hidroxitolueno (BHT) e pela adição de ácido etileno diamino tetracético (EDTA) à formulação lipídica para remover metais pesados. A hidrólise lipídica leva à formação de lisofosfatidilcolina (lyso-PC) que acentua a permeabilidade dos lipossomas, o que prejudica a integridade da formulação.

Além da degradação oxidativa dos lipídios, Edwards e Baeumner (2006) afirmam que preparações de lipossomas que apresentam uma heterogeneidade em seu tamanho representam um potencial problema em sua estabilidade física. A instabilidade física pode ainda ser causada pela liberação do fármaco encapsulado da vesícula, e/ou agregação ou fusão

das vesículas para formar grandes partículas. Este processo influencia o desempenho *in vivo* da formulação, podendo afetar o índice terapêutico do fármaco (SHARMA; SHARMA, 1997).

Muitas tentativas têm sido realizadas para aperfeiçoar a estabilidade dos lipossomas. Entre elas, a modificação da superfície é um método atrativo para melhorar a estabilidade *in vitro* e *in vivo* do sistema (TAKEUCHI et al., 1998). Lasic (1998) afirma que a estabilidade biológica pode ser determinada pelo tempo de circulação dos lipossomas na corrente sanguínea, o que está diretamente relacionado com a presença de agentes que interagem com os lipossomas. A compatibilidade sanguínea é um importante fator na avaliação dos lipossomas como carreadores de fármaco na corrente circulatória, uma vez que as células sanguíneas iniciam o processo de coagulação imediatamente quando em contato com materiais estranhos (CEH et al., 1997; TAKEUCHI et al., 2000; ISHIHARA et al., 2002).

Para exercer atividade terapêutica, faz-se necessário que o sistema carreador contendo o fármaco permaneça tempo suficiente na corrente sanguínea, a fim de atingir o alvo. Entretanto, quando lipossomas convencionais são administrados *in vivo*, são rapidamente removidos da corrente circulatória através das células fagocitárias do sistema retículo endotelial (RES) (PINTO-ALPHANDARY et al., 2000; BATISTA et al., 2007).

De acordo com Torchilin (2005) o tamanho e a composição lipídica são determinantes na permanência dos lipossomas na circulação. Quanto ao tamanho, a redução do diâmetro dos lipossomas implica em um menor reconhecimento pelo Sistema Reticuloendotelial (RES) e quanto à sua composição lipídica, a inclusão de fosfolipídios saturados e esteróis, que reduzem a fluidez da membrana resultam em uma maior permanência desta preparação na circulação sanguínea.

Segundo Gabizon et al. (1997) e Torchilin (2005) o revestimento polimérico empregando polímeros hidrofílicos como o polietilenoglicol (PEG) é um método alternativo para a modificação da superfície dos lipossomas, conferindo proteção às vesículas contra a opsonização e mecanismo de eliminação.

Pesquisas com formulações lipossomais de anfotericina B com o intuito de aumentar o índice terapêutico do fármaco, bem como reduzir sua nefrotoxicidade, vêm sendo amplamente utilizadas para o tratamento de micoses por espécies de *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cryptococcus* e outros fungos de alta e baixa patogenicidade. Contudo, são onerosas e geralmente não são a primeira opção de tratamento (KELSEY et al., 1999; WALSH et al., 2001; KHAN; NASTI;OWAIS, 2005; SIONOV et al., 2006; NAHAR et al., 2008; OLSON et al., 2010; WANG et al., 2010).

Em contrapartida, ciclopirox olamina tem sido estudado e avaliado quanto a sua eficácia em sistemas de liberação controlada, apesar de serem escassos os trabalhos nesta área. Em artigo recente, Shaikh; Pawar (2010) desenvolveram uma formulação lipossomal contendo o fármaco com o objetivo de aumentar sua absorção cutânea para tratamento de infecções superficiais. Os lipossomas foram preparados pelo método de injeção de etanol e os autores obtiveram lipossomas de tamanho variando de $196 \pm 1,73$ a $1040,66 \pm 7,02$ nm e eficiência de encapsulação variando de $34,28 \pm 4,4$ a $54,89 \pm 1,9$. Neste estudo, foi realizado um planejamento fatorial 2^{4-1} para otimizar as concentrações de colesterol e fosfolípidos. Segundo os autores, encapsulação em lipossomas preserva a principal característica da molécula requerida para sua ação antifúngica, sendo os lipossomas uma ferramenta importante para potencializar a ação do fármaco no tratamento de micoses.

Devido às limitações do uso da anfotericina B e o desenvolvimento de resistência ao fármaco considerado de escolha, faz-se necessário o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para serem utilizadas em substituição ou associadas aos fármacos disponíveis, podendo reduzir a toxicidade e aumentar a eficácia terapêutica. Ciclopirox olamina não apresenta efeitos tóxicos proeminentes e sua eficácia antifúngica já foi demonstrada em várias pesquisas *in vitro* e *in vivo*. Formulações lipossomais sistêmicas contendo o referido fármaco para o combate à neurocriptococose contribuirá para uma melhor qualidade de vida de pacientes imunocomprometidos, sobretudo os soropositivos para o HIV.

Tabela 1 Características fenotípicas, epidemiológicas e genéticas de *C. neoformans* e *C. gattii*

Espécie, variedade, sorotipo	Patogenia	Termotolerância <i>in vitro</i> (°C)	Sensibilidade à glicina (Teste de CGB)	Sensibilidade aos antifúngicos	Habitats	Distribuição geográfica	Tipos Moleculares
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> (sorotipo A)	Oportunista (SNC)	38 - 40	Sensível	Sensível	Solo, excreta de aves	Cosmopolita	VNI
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> (sorotipo D)	Oportunista	38 - 40	Sensível	Sensível	Solo, excreta de aves	Cosmopolita (principalmente Europa)	VNIV
<i>C. gattii</i> (sorotipo B)	Infecção primária; lesões pulmão e SNC	35	Resistente	Sensibilidade dose-dependente	Material vegetal (<i>Eucalyptus</i> sp.)	Áreas tropicais e subtropicais	VGI
<i>C. gattii</i> (sorotipo C)	Infecção primária; lesões pulmão e SNC (menor prevalência)	35	Resistente	Sensibilidade dose-dependente	Material vegetal (<i>Eucalyptus</i> sp.)	Áreas tropicais e subtropicais	VGIII
Sorotipo AD (híbrido)	Oportunista (SNC)	38 - 40	Sensível	Sensível	Solo, excreta de aves	Cosmopolita (Europa)	VNIII

VN: variedade *neoformans*; VG: variedade *gattii*; (MEYER et al., 2003; ENANCHE-ANGOULVANT et al., 2007; BOVERS; HAGEN; BOEKHOUT, 2008; CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008; HUSTON; MODY, 2009; DELIO et al., 2010; ALBUQUERQUE; RODRIGUES, 2012).

3 REFERÊNCIAS

- ABBEG, M.A.; CELLA, F.L.; FAGANELLO, J.; VALENTE, P.; SHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of Psittaciformes in a Southern Brazilian Zoological Garden. **Mycopathologia**, v. 161, p 83-91, 2006.
- ABRAMS, B.B; HANEL, H.; HOEHLER, T. Ciclopirox olamine: a hidroxypyridone antifungal agent. **Clinics in Dermatology**, v.9, p 471-477, 1992.
- ABU-LILA, A. S.; KIZUKI, S.; DOI, Y.; SUZUKI, T.; ISHIDA, T.; KIWADA, H. Oxaliplatin encapsulated in PEG-coated cationic liposomes induces significant tumor growth suppression via a dual-targeting approach in a murine solid tumor model. **J Control Release**, v.137, p 8-14, 2009.
- 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, A. M. F.; MATSUMOTO, M. T.; BAEZA, L. C.; OLIVEIRA E SILVA, R. B.; KLEINER, A. A. P.; MELHEM, M. S. C.; GIANNINI¹, M. J. S. M.; The Laboratory Group on Cryptococcosis. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical sequential isolates of *Cryptococcus neoformans* from São Paulo State, Brazil. **FEMS Yeast Res**, v. 7, p 152–164, 2007.
- ALPERMANN HG, SCHUTZ E. Studies on the pharmacology and toxicology of ciclopiroxolamine. **Arzneimittelforschung**, v.31, p 1328-1332, 1981.
- AVERBUCH, D.; et al. Fungemia in a cancer patient caused by fluconazole-resistant *Cryptococcus laurentii*. **Med Mycol**, v.40, p 479-484, 2002.
- BANGHAM, A. D. “A correlation between surface charge and coagulant action of phospholipids”. **Nature**, v.192, p 1197-1198, 1961.

BARCHIESI, F.; SCHIMIZZI, A.M.; CASELLI, F.; NOVELLI, A.; FALLANI, S.; GIANNINI, D.; ARZENI, D.; CESARE, S.; FRANCESCO, L.F.; FORTUNA, M.; GIACOMETTI, A.; CARLE, A.; MAZZET, T.; SCALISE, G. Interactions between triazoles and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.44, p 2435-2441, 2000.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. *Yeast: characteristics and identification*. 2000. 3 ed. Cambridge: University press, 1139p.

BARONI, F.A.; et al. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro city, RJ, Brazil. **Rev Inst Med Trop**, v.48, p 71-75, 2006.

BARROS, M.E.S.; SANTOS, D.A.; HAMDAN, J.S. In vitro methods for antifungal susceptibility testing of *Trichophyton* spp. **Mycological Research**, v. 110, n. 11, p. 1355-1360, 2006.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Braz J Pharm Sci** 43, 167-179, 2007.

BAUTERS, T. G. M.; SWINNE, D.; BOEKHOUT, T.; NOENS, L.; NELIS, H. J. Repeated isolation of *Cryptococcus laurentii* from the oropharynx of an immunocompromized patient. **Mycopathologia**, v. 153, p. 133-135, 2001.

BERNARDO, F.M.; MARTINS, H.M.; MARTINS, M.L. Urban sources of *Cryptococcus* sp.-Lisbon (Portugal). **RPCV**, v. 96, p 157-160, 2001.

BIANIC, T.; HARRISON, T.S. *Cryptococcal meningitis*. **British Medical Bulletin**, v.72, p 99-118, 2004.

BIRNBAUM, D.T.; BRANNO-PEPPAS, L. Microparticle drug delivery systems. **Drug Delivery Systems**, v.5, p 38-117, 2003.

BIVANCO, F.C.; MACHADO, C.A.S., MARTINS, E.L. *Cutaneous cryptococcosis*. **Arq Med ABC**, v.31, p 102-109, 2006.

BOEKHOUT, T.; VAN BELKUM, A. Variability of karyotypes and RAPD types in genetically related strains of *Cryptococcus neoformans*. **Current Genetics**, v. 32, p. 203-208, 1997.

BOHR, M.; KRAEMER, K.T. Dermatopharmacology of Ciclopirox nail lacquer topical solution 8% in the treatment of onychomycosis. **JAAD**, v.43, p 57-69, 2000.

BOVERS, M.; et al. Identification of genotypically diverse *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates by Luminex xMAP technology. **J Clin Microbiol**, v.45, p 1874-1883.

BOVERS, M.; et al. Identification of genotypically diverse *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates by Luminex xMAP technology. **J Clin Microbiol**, v. 45, p. 1874-1883, 2007.

BRANDT, M.E.; et al. For the Cryptococcal disease active surveillance group. Trends in antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates in the United States: 1992 to 1994 and 1996 to 1998. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45, p 3065-3069, 2001.

BYRNES J. E., LI, W., LEWIT, Y., MA, H., VOELZ, K., REN, P., CARTER, D.A.; CHATURVEDI, V.; BILDFELL, R.J.; MAY, R.C.; HEITMAN, J. Emergence and Pathogenicity of Highly Virulent *Cryptococcus gattii* Genotypes in the Northwest United States. **PLoS Pathogens**, v.6, p e1000850, 2010.

CAPOOR, M. R.; MANDAL, P.; DEB, M.; AGGARWAL, P.; BANERJEE, U. Current scenario of cryptococcosis and antifungal susceptibility pattern in India: a cause for reappraisal. **Mycoses**, v. 51, p. 258-265, 2008.

CARFARCHIA, C.; CAMARDA, A.; ROMITO, D.; CAMPOLO, M.; QUAGLIA, N. C.; TULLIO, D.; OTRANTO, D. Occurrence of yeast in cloacae of migratory birds. **Mycopathologia**, v. 161, p. 229-34, 2006a.

CARVALHO, A., COSTA-DE-OLIVEIRA, S., MARTINS, M.L., VAZ-PINA, C., RODRIGUES, A.G., LUDOVICO, P., RODRIGUES, F. Multiplex PCR identification of some clinically relevant species. **Med. Mycol**, v.49, p 619-627, 2007.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J.R. *Cryptococcus neoformans*. Washington, D.C., American Society for Microbiology Press, 1998. 541p.

CASALI, A.K.; et al. *Cryptococcus neoformans*: aspectos moleculares e epidemiológicos. **J Clin Microbiol**, v.20, p34-37, 2001.

CASALI, A.K.; et al. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **FEMS Yeast Res**, v.3, p 405-415, 2003.

CAVALCANTI I.M.F, MENDONÇA EAM, LIRA MCB, HONRATO SB, CAMARA CA, AMORIM RVS, FILHO, J M, RABELLO MM, HERNANDES MZ, AYALA AP, SANTOS-AGALHÃES NS. The encapsulation of b-lapachone in 2-hydroxypropyl-b-cyclodextrin inclusion complex into liposomes: A physicochemical evaluation and molecular modeling approach. **Eur J Pharm Sci**, doi:10.1016, 2011.

CEH, B.; WINTERHALTER, M.; FREDERIK, P. M.; VALLNER, J. J.; LASIC, D. D. Stealth® liposomes: from theory to product. **Adv drug deliv rev**, v.24, p 165-177, 1997.

CHANDENIER, J.; ADOU-BRYN, K. D.; DOUCHET, C.; SAR, B.; KOMBILA, M.; SWINNE, D.; THÉRIZOL-FERLY, M.; BUISSON, Y.; RICHARD-LENOBLE, D. In vitro activity of amphotericin B, fluconazole and voriconazole against 162 *Cryptococcus neoformans* isolates from Africa and Cambodia. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 23, p. 506–508, 2004.

CHENG, M. F.; CHIOU, C. C.; LIU, Y. C.; WANG, H. Z.; HSIEH, K. S. *Cryptococcus laurentii* fungemia in a premature neonate. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p. 1608-1611, 2001.

CHORILLI M, LEONARDI GR, OLIVEIRA AG, SCARPA MV. Lipossomas em formulações dermocosméticas. **Infarma**, v.6, p 75-9, 2004.

CHRETIEN, F.; LORTHOLARY, O.; KANSAU, I.; NEUVILLE, S.; GRAY, F.; DROMER, F. Pathogenesis of cerebral *Cryptococcus neoformans* infection after fungemia. **J Infect Dis**, v. 186, p 522-530, 2002.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Reference Method for Broth Dilution Testing of Yeasts*. Approved standard document M27-A3, Wayne, PA, USA: CLSI, 2008.

CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE. Relatório Técnico. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, p. 524-544, 2008.

COPPI, G.; SILINGARDI, S. HPLC method for pharmacokinetic studies on ciclopirox olamine in rabbits after intravenous and intravaginal administrations. **Farmaco**, v.47, p. 779-786, 1992.

CORRÊA, M.P.S.C.; et al. Criptococose em crianças no estado do Pará, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.32, p 505-8, 1999.

CORRÊA, M.P.S.C.; et al. The spectrum of computerized tomography (CT) findings in cerebral nervous system (CNS) infection due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in immunocompetent children. **Rev Inst Med Trop** v. 44, p 283-287, 2002.

CORTI, M., VILLAFANE1, M.F., NEGRONI, RICARDO; ARECHAVALA, A.; MAIOLO, E. Magnetic resonance imaging findings in AIDS patients with central nervous system cryptococcosis. **Rev Iberoam Micol**, v.25, p 211-214, 2008.

COSTA, A. K., SIDRIM, J. J., CORDEIRO, R. A., BRILHANTE, R. S. N., MONTEIRO, A. J.; ROCHA, M. F. Urban pigeons (*Columba livia*) as a potential source of pathogenic yeast: a focus on antifungal susceptibility of *Cryptococcus* strains in Northeast Brazil. **Mycopathologia**, doi 10.1007/s11046-009-9245-1, 2009.

CUENCA-ESTRELA, M.; LEE-YANG, W.; CIBLAK, M.A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; MELLADO, E.; WARNOCK, D.W. RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. Comparative

evaluation of NCCLS M27-A and EUCATEST broth microdilution procedures for antifungal susceptibility testing of *Candida* species. **Antimicrob Agents Chemother**, v.46, p 3644-3647, 2002.

CUENCA-ESTRELLA, M.; et al. Flucytosine primary resistance in *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 20, p. 276-279, 2001.

DARZÉ, C.; et al. Características clínicas laboratoriais de 104 casos de meningoencefalite criptocócica. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 33, p. 21-6, 2000.

DAS, N. G.; DAS, S. K. Controlled-release of oral dosage forms. **Formulation, Fill & Finish**, v. 27, p. 10-16, 2003.

DAVIS, M. E.; CHEN, Z. G.; SHIN, D. M. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. **Nat Rev Drug Discov**, v.7, p 771-782, 2008.

DE HOOG, G.S. et al. 2000. *Atlas of Clinical Fungi*. 2 ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures: Universitat Rovira i Virgili, 1126p.

DEHVARI, K.; LIN, S. Synthesis, Characterization and Potential Applications of Multifunctional PEO-PPOPEO- Magnetic Drug Delivery System. **Curr Med Chem**, v.19, p. 5199-204, 2012.

DIAZ, M.R.; FELL, J.M. Use of a suspension array for rapid identification of the varieties and genotypes of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **J Clin Microbiol**, v.43, p 3662-3672, 2005.

DILHUYDY, M.S.; et al. Cutaneous cryptococosis with alemtuzumab in a patient treated for chronic lymphocytic leukaemia. **British J Haematol**, v.137, p 490, 2007.

DILLON, RF; LASCANO, CD; RIERA, F.; ALBIERO, E. Cutaneous Cryptococosis in a patient with Behçet's disease and colon cancer, **Reumatol Clin**, v.7, p 147–148, 2011.

DISMUKES, W.E. Introduction to antifungal drugs. **Clin Infect Dis**, v.30, p 653-657, 2000.

DUIN, D.V.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J.D. 2002. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* Reduces Their Susceptibilities to Amphotericin B and Caspofungin. **Antimicrob Agents Chemother** 46(11):3394-3400.

DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. *Nanotecnologia: Introdução, preparação, caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação*. São Paulo: ArtLiber, 2006.

EDWARDS, K. A.; BAEUMNER, A. J. Analysis of liposomes. **Talanta**, v.68, p 1432-1441, 2006.

EHRENSING, E.R.; SAAG, M.S. Criptococose. In: SAROSI, G.A.; DAVIES, S.F. *Doenças fúngicas do pulmão*. 3ed. Rio de Janeiro: Revinter, cap 7, 89-101, 2001.

ENANCHE-ANGOULVANT, A., CHANDENIER, J., SYMOENS, F., LACUBE, P., BOLOGNINI, J., DOUCHET, C., POIROT, J. L. & HENNEQUIN, C. Molecular identification of *Cryptococcus neoformans* serotypes. **J Clin Microbiol**, v.45, p 1261-1265, 2007.

ESCANDÓN, P.; SÁNCHEZ, A.; MARTÍNEZ, M.; MEYER, W.; CASTAÑEDA, E. Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. **FEMS Yeast Res**, v. 6, p. 625-635, 2006.

FENG X, YAO Z, REN D, LIAO W. Simultaneous identification of molecular and mating types within the *Cryptococcus* species complex by PCR-RFLP analysis. **J Med Microbiol**, v.57, p 1481–1490, 2008.

FERNANDES, O.F.L.; et al. *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.33, p 75-78, 2000.

FERNANDES, O.F.L.; et al. *In vitro* susceptibility characteristics of *Cryptococcus neoformans* varieties from AIDS patients in Goiânia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.98, p 839-41, 2003.

FERNÁNDEZ-TORRES, B.; CABAÑES, F.J.; CARRILLO-MUÑOZ, A.J.; ESTEBAN, A.; FICA, C.A. Tratamiento de infecciones fúngicas sistêmicas. III parte: anfotericina B, aspectos farmacoeconómicos y decisiones terapéuticas. **Rev Chil Infect**, v.21, p 317-26, 2004.

FILE, JTM. Visão geral sobre resistência antimicrobiana nos anos 90. **Ple Chest**, v.2, p 3-8, 2000.

FILIPPIN, F.B.; SOUZA, L.C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Braz J Pharm Sci**, v.42, p 167-194, 2006.

FILIÚ, W.F.O.; et al.. Cativoiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na Cida de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.35, p 591-595, 2002.

FRANZOT, S. P., I. F. SALKIN, AND A. Casadevall. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **J Clin Microbiol**, v.37, p 838–840, 1999.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; SCHETINI, D. A.; ROCHA, O. G. F. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimónio. **Química Nova**, v.28, p 511-518, 2005.

FRIES BC, COX GM. Cryptococcosis in AIDS. In: *Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast*. Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Casadevall A (Eds). American Society for Microbiology, Washington, DC, USA, p 515–526, 2011.

GABIZON, A.; GOREN, D.; HOROWITZ, A. T.; TZEMACH, D.; LOSSOS, A.; SIEGAL, T. Long-circulating liposomes for drug delivery in cancer therapy: a review of biodistribution studies in tumor-bearing animals. **Adv drug deliv rev**, v.24, p 337-344, 1997.

GHANNOUM, M.A.; et al. Interlaboratory study of quality control isolates for a broth microdilution method (modified CLSI M38-A) for testing susceptibilities of dermatophytes to antifungals. **J Clin Microbiol**, v. 44, p. 4353-4356, 2006.

GRAYBILL, J.R. The role of murine models in the development of antifungal therapy for systemic mycosis. **Drug Resist Updat**, v.3, p 364-383, 2000.

GUNDES, S. G.; GULENC, S.; BINGOL, R. Comparative performance of Fungichrom I, Candifast and API 20C AUX systems in the identification of clinically significant yeasts. **J Med Microbiol**, v. 50, p. 1105-1110, 2001.

GUPTA AK. Ciclopirox nail lacquer: a brush with onychomycosis. **Cutis**, v.68, p 13-6, 2001a

GUPTA AK. Ciclopirox topical solution, 8% combined with oral terbinafine to treat onychomycosis: a randomized, evaluator-blinded study. **J Drugs Dermatol**, v.4, p 481-5, 2005c.

GUPTA, A.K. Ciclopirox: an overview. **Int J Dermatol**, v.40, p 305–310, 2001.

GUPTA, A.K. Ciclopirox olamina: an overview. **Inter J Dermatol**, v.40, p 305-310, 2001b.

GUPTA, A.K. AND SKINNER, A.R. Ciclopirox for the treatment of superficial fungal infections: a review. **Int J Dermatol**, v.42, p 3–9, 2003.

GUPTA, A.K., Schouten, J.R.; Lynch, L.E. Ciclopirox nail lacquer 8% for the treatment of onychomycosis: a Canadian perspective. **Skin Therapy Lett**, v.10, p 1-3, 2005.

GUPTA, A.K.; KOHLI, Y. *In vitro* susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and non dermatophytes, and *in vitro* evaluation of combination antifungal activity. **British J Dermatol**, v.149, 296-305, 2003.

GUPTA, A.K; PLOTT, T. Ciclopirox: abroad-spectrum with antibacterial and anti-inflammatory properties. **Inter J Dermatol**, v.43, p 3-8, 2004.

GUPTA, G.; FRIES, B.C. Variability of phenotypic traits in *Cryptococcus* varieties and species and the resulting implications for pathogenesis. **Future Microbiol**, v.5, p 775-787,

2010.

HANNEL, H.; ROETHER, W.; DITTMAR, W. Evaluation of the fungicidal action of *in vitro* and in a skin model considering the influence of penetration kinetics on various standards antimycotics. **J NY Acad Sci**, v.544, p 329-337, 1998.

HONSHO, C.S.; et al. Generalized systemic cryptococosis in a dog after immunosuppressive corticotherapy. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.55, p 155-159, 2003.

HUANG, W.; ZHANG, Z.; HAN, X.; TANG, J.; WANG, J.; DONG, S.; WANG, E. Ion channel behavior of amphotericin B in sterol-free and cholesterol or ergosterol-containing supported bilayer model membranes investigated by electrochemistry and spectroscopy. **Biophys J**, v.83, p 3245-3255, 2002.

HULL, C.M.; HEITMAN, J. 2002. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. **Annu Rev Genet**, v.36, p 557-615, 2002.

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

IDNURM, A.; BAHN, Y.S.; NIELSEN, K.; LIN, X.; FRASER, J.A.; HEITMAN, J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nat Rev Microbiol**, v.3, p753-764, 2005.

IGREJA, R.P.; et al. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro. **Med Mycol**, v.42, p 229-38, 2004.

IKEDA, R.; SUGITA, T.; JACOBSON, E. S.; SHINODA, T. Laccase and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*. **J Clin Microbiol**, v. 40, p. 1214-1218, 2002.

INZA, I.; ABARCA, L.; GUARRO, J. Collaborative evaluation of optimal antifungal susceptibility testing conditions for dermatophytes. **J Clinl Microbiol**, v. 40, p 3999-4003, 2002.

ISHIHARA, K.; TSUJINO, R.; HAMADA, M.; TOYODA, N.; IWASAKI, Y. Stabilized liposomes with phospholipid polymers and their interactions with blood cells. **Colloids and surfaces**, v.25, p 325-333, 2002.

IWATA, K.; YAMAGUCHI, H. Studies on the mechanism of antifungal action of ciclopirox olamine. **Drug Res**, v.31, p1323-1327, 1981.

JAIN, N.; et al. Molecular epidemiology of clinical *Cryptococcus neoformans* strains from India. **J Clin Microbiol**, v.43, p 5733-5742, 2005.

JANBON, G. *Cryptococcus neoformans* capsule biosynthesis and regulation. **FEMS Yeast Res**, v.4, p 765-771, 2004.

JESSUP, C.J.; WARNER, J.; ISHAM, N.; HASAN, I.; GHANNOUM, M.A. Antifungal Susceptibility Testing of Dermatophytes: Establishing a Medium for Inducing Conidial Growth and Evaluation of Susceptibility of Clinical Isolates. **J Clin Microbiol**, v. 38, p 341–344, 2000.

JONES, E.D. Onychomycosis: current treatment options. **J Am Acad Nurse Pract**, v.15, p 165-169, 2003.

JUE, S.G.; DAWSON, G.W.; BROGDEN, R.N. Ciclopirox olamine 1% cream. A preliminary review if its antimicrobial activity and therapeutic use. **Drugs**, v.29, p 330-341, 1985.

KANAFANI, Z.A.; PERFECT, J.R. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clin Infect Dis**, v.46, p 120-128, 2008.

KELSEY, S. M.; GOLDMAN, J. M.; MCCANN, S.; et al. Liposomal amphotericin (AmBisome) in the prophylaxis of fungal infections in neutropenic patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Bone Marrow Transplant**, v.23, p 163-168, 1999.

KHAN MA, NASTI TH, OWAIS M. Incorporation of amphotericin B in tuftsin-bearing liposomes showed enhanced efficacy against systemic cryptococcosis in leucopenic mice. **J Antimicrob Chemother**, v.56, p 726–731, 2005.

KHAN, Z. U; AL-ANEZI, A. A.; CHANDY, R.; XU, J. Disseminated cryptococcosis in an AIDS patient caused by a canavanine-resistant strain of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. **J Med Microbiol**, v. 52, p. 271-275, 2003.

KHAWCHAROENPORN, T.; APISARNTHANARAK, A.; MUNDY, L. M. Non-*neoformans* cryptococcal infections: a systematic review. **Infection**, v. 35, p. 51-58, 2007.

Kidd, S.E.; Hagen, F.; Tschärke, R.L.; Huynh, M.; Bartlett, K.H.; Fyfe, M.; Macdougall, L.; Boekhout, T.; Kwon-Chung, K.J.; Meyer, W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA** 101, 17258–17263, 2004.

KOKJOHN, K.; BRADLEY, M.; GRIFFITHS, B. Evaluation of in vitro activity of ciclopirox olamine, butenafine HCL and Econazole nitrate against dermatophytes, yeasts and bacteria. **Inter J Dermatol**, v.42, p 11-17, 2003.

KOMMERS, G.D.; et al. Granulomatous cryptococcal pneumonia in a horse. **Cienc Rural**, v.35, p 938-940, 2005.

KWON-CHUNG KJ, BOEKHOUT T, FELL JW, DIAZ M 2002. (1557) Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellonycetidae). **Taxon**, v.51, p 804-806, 2002.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHEK, I.; BENNETT, J. E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). **J Clin Microbiol**, v. 15, p. 535-537, 1982.

LACAZ, C.S.; et al. *Tratado de Micologia Médica*. 9 ed. São Paulo: Sarvier, 1104p, 2002a.

LARSEN, R.A.; BAUER, M.; THOMAS, A.M.; GRAYBILL, J.R.; Amphotericin B and fluconazole, a potent combination therapy for cryptococcal meningitis. *Antimicrob agents chemother*, v.48, p 985-991, 2004.

LARSSON, C.E.; et al. Canine ocular cryptococosis: a case report. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.55, p 533-538, 2003.

LASIC, D. D. Novel applications of liposomes. **Tibtech**, v.16, p 307-321, 1998.

LASIC, D. D. Liposomes. *Science & Medicine*, v.1, p 35-43, 1996.

LATOUCHE, G.N., HUYNH, M., SORRELL, T.C. AND MEYER, W. PCR-Restriction Fragment Length 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.

LEE, Y.A. et al. First report of *Cryptococcus albidus* – induced disseminated cryptococcosis in a renal transplante recipient. **Korean J Intern Med**, v.19, p 53-57, 2004.

LI, X.; DING, L.; XU, Y.; WANG, Y.; PING, Q. N.Targeted delivery of dextrorubicin using stealth liposomes modified with transferrin. **Int J Pharm**, v. 373, p 116-123, 2009.

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

LITVINTSEVA, A.P.; et al. Comparative analysis of environmental and clinical populations of *Cryptococcus neoformans*. **J Clin Microbiol**, v.43, p 556-64, 2005.

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

LUCAS S., MARTINS M. L., FLORES O., MEYER W., SPENCER-MARTINS I., INÁCIO J. Differentiation of *Cryptococcus neoformans* varieties and *Cryptococcus gattii* using CAP59-based loop-mediated isothermal DNA amplification. **Clin. Microbiol. Infect**, v.16: 711 – 714., 2010.

LUISI, S.B.; et al. Use of amphotericin B as antifungal agent in a culture medium for human dental pulp cells. **Rev Odonto Cienc**, v.23, p 58-62, 2008.

MACDOUGALL, L.M.; FYFE, M. Emergence of *Cryptococcus gattii* in a novel environment provides clues to its incubation period. **J Clin Microbiol**, v.44, p 1851-1852, 2006.

MAJET, N.V.; KUMAR, R. Nano and Microparticles as controlled drug delivery devices. **J Pharm Pharmaceut Sci**, 3(2): 234-258, 2000.

MARTINEZ, L.R.; GARCIA-RIVERA, J.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) strains are more susceptible to heat than *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotype A) strains. **J Clin Microbiol**, v.39, p 3365-3367, 2001.

MASSONET, C.; ELDERE, J.V.; VANECHOUTTE, 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.

MATSUMOTO MT, FUSCO-ALMEIDA AM, BAEZA LC, et al. Genotyping, serotyping and determination of mating-type of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from Sao Paulo State, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 49: 41–47, 2007.

MCCURDY, L.H.; MORROW, J.D. Ventriculitis due to *Cryptococcus uniguttulatus*. **South Med J**, v.94, p 65-66, 2001.

MEDEIROS, C.S.Q., LIMA-FILHO, J.V., OLIVEIRA, P. C., ANDRADE, S.L., LEAL, A.F.G., CAMARA, C.A. and NEVES, R. P. Antifungal activity of beta-lapachone against disseminated infection by *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* strain 5811 on immunosuppressed Swiss mice. **Braz J Med Biol Res**, v.43, p 345-349, 2010.

MELO N.T., et al. Quimiotipagem do *Cryptococcus neoformans*. Revisão de Literatura. Novos dados epidemiológicos sobre a criptococose. Nossa experiência com o emprego do meio C.G.B. no estudo daquela levedura. **Rev Inst Med Trop**, v.35, p 469-478, 1993.

MEYER, W.; CASTAÑEDA, A.; JACKSON, S.; HUYNH, M.; CASTAÑEDA, E. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerg Infect Dis**, v. 9, p. 189-195, 2003.

MEYER, W.; MARSZEWSKA, K.; AMIRMOSTOFIAN, M.; IGREJA, R. P.; HARDTKE, C.; METHLING, K.; VIVIANI, M. A.; CHINDAMPORN, A.; SUKROONGREUNG, S.; JOHN, M. A.; ELLIS, D. H.; SORRELL, T. C. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA - a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. **Electrophoresis**, v. 20, p. 1790-1799, 1999.

MINISTÉRIO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, BRASIL. *Relatório nanotecnologia: investimentos, resultados e demandas*, 2006.

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

MOHANRAJ, V.J.; CHEN, Y. Nanoparticles- A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, vol.5, p 561-573, 2006.

MORA, D.J.; PEDROSA, A.L.; RODRIGUES, V., MAFFEI, C.M.L.; TRILLES, L.; LAZÉRA, M.S; SILVA-VERGARA, M.L. **Genotype and mating type distribution within clinical *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from patients with cryptococcal meningitis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil**, **Med Mycol**, v.48, p 561–569, 2010.

MORA, D.J.; PEDROSA, A.L.; RODRIGUES, V.; MAFFEI, C.M.L.; TRILLES, L.; LAZÉRA, M.S.; SILVA-VERGARA, M.L. Genotype and mating type distribution within clinical *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from patients with cryptococcal meningitis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Med Mycol** v.48, p 561–569, 2010.

MORA-DUARTE, J.; BETTS, R.; ROTSTEIN, C.; COLOMBO, A.L.; THOMPSON-MOYA, L.; SMIETANA; LUPINACC, R. SABLE, C.; KARTSONIS, N.; PERFECT, J.; Comparison of Caspoungin and amphotericin B for invasive candidiasis. **NEJM**, v.347, p 2020-2029, 2002.

MOREIRA, T.A.; FERREIRA, R.M.R.; BORGES, A.S. Cryptococcosis: clinical epidemiological laboratorial study and fungi varieties in 96 patients. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.39, p 255-258, 2006.

NAHAR M, PHARM M, MISHRA D, DUBEY V, JAIN N K. Development, characterization, and toxicity evaluation of amphotericin B-loaded gelatin nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.4, p 252–261, 2008.

NAKAMURA, Y.; KANO, R.; SATO, H; WATANABE; S; TAKAHASHI; H.; HASEGAWA, A. Isolates of *Cryptococcus neoformans* serotype A and D developed on canavanine-glycine-bromthymol blue medium. **Mycoses**, v. 41, p. 35-40, 1998.

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

NEW, R. R.; CHANCE, M. L.; HEATH, S. Antileishmanial activity of amphotericin and other antifungal agents entrapped in Liposomes. **J Antimicrob Chemother**, v.8, p 371-381, 1981.

NIELSEN K.; OBALDIA, A. L.; HEITMAN, J. 2007. *Cryptococcus neoformans* Mates on Pigeon Guano: Implications for the Realized Ecological Niche and Globalization. **Eukaryotic Cell**, v.6, p 949–959, 2007.

NIEWERTH, M; et al. Ciclopirox Olamine treatment affects the expression pattern of *Candida albicans* genes encoding virulence factors, iron metabolism proteins, and drug resistance factors. **Antimicrob Agents Chemother**, v.47, p 1805-1817, 2003.

NOGUEIRAS-NIETO L, SOBARZO-SÁNCHEZ E, GÓMEZ-AMOZA JL, OTERO-ESPINAR FJ. Competitive displacement of drugs from cyclodextrin inclusion complex by polypseudorotaxane formation with poloxamer: Implications in drug solubilization and delivery. **Eur. J. Pharm. Biopharm**, doi:10.1016/j.ejpb.2011.12.001, 2012.

NORRIS, H.A.; ELEWSKI, B.E.; GHANNOUM, M.A. Optimal growth conditions for the determination of the antifungal susceptibility of three species of dermatophytes with the use of a microdilution method. **J Am Acad Dermatol**, v. 40, p. Sp-S13, 1999.

NUCCI, M.; MARR, K.A. Emerging fungal diseases. **Clin Infect Dis**, v.41, p 521-526, 2005.
NÚÑEZ, M.; et al. Pulmonary Cryptococcosis in the Immunocompetent Host : therapy with fluconazole: a report of four cases and a review of the literature. **American College of Chest Physicians**, v.118, p 527-534, 2000.

OLIVEIRA PC, MEDEIROS CS, MACÊDO DP, ANDRADE SL, CORREIA MT, MESQUITA SD, LIMA-NETO RG, NEVES RP. Ciclopirox olamine: an antifungal alternative against cryptococcosis. **Lett Appl Microbiol**, v.51, p 485-9, 2010.

OLSON, JA; GEORGE A; CONSTABLE, D.; SMITH, P.; PROFFITT, R.T.; ADLER-MOORE, J.P. Liposomal Amphotericin B and Echinocandins as Monotherapy or Sequential or Concomitant Therapy in Murine Disseminated and Pulmonary *Aspergillus fumigatus* Infections. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, p 3884–3894, 2010.

ORDÓÑEZ, N.; CASTAÑEDA, E. Varieties and serotypes of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates in Colombia. **Rev Iberoam Micol**, v.18, p.128-130, 2001.

OSUNA, P.; CARRAGOSO, A.; LEMOS, A.; MOCHO, M. L.; GASPAR, O. Criptococose, **Acta Medica Portuguesa**, v. 21, p. 307-313, 2008.

PAPPALARDO, M.C.S.M.; MELHEM, M.S.C. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. **Rev Inst Med Trop**, v.45, p 299-305, 2003.

PARK BJ, WANNEMUEHLER KA, MARSTON BJ, GOVENDER N, PAPPAS PG, CHILLER TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v.23, p 525–530, 2009.

PASCHOAL, R. C., HIRATA, M. H.; HIRATA, R. C.; MELHEM, M. S. C.; DIAS, A. L. T.; PAULA, C. R. Neurocryptococcosis: diagnosis by PCR method. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 46 p. 203-207, 2004.

PEDROSO, R. S.; CANDIDO, R. C. Diagnóstico laboratorial da criptococose. **NewsLab** - edição 77, p. 94-102, 2006.

PEDROSO, R. S.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C. *In vitro* susceptibility to antifungal agents of environmental *Cryptococcus* spp. isolated in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 239-243, 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, LAVRADOR, M.AS; FERREIRA, J.C, CANDIDO, RC, MAFFEI, CML. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* – Pathogenicity of environmental isolates correlated to virulence factors, susceptibility to fluconazole and molecular profile. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.105, p 993-1000, 2010.

PEER, D.; KARP, J. M.; HONG, S.; et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. **Nature Nanotechnology**, v.2, p 751-60, 2007.

PEREA, S.; PATTERSON, T.F.; Antifungal resistance in pathogenic fungi. **Antimicrobial resistance**, v.15, p 1073-1080, 2002.

PEREIRA, A.P.C.; COUTINHO, S.D.A. Criptococose em cães e gatos- revisão. **Rev Clin Vet**, v.8, p 24-32, 2003.

PERFECT, J.R. *Cryptococcus neoformans*: a sugar-coated killer with designer genes. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.45, p 395-404, 2005.

PFALLER, M.A. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. **Am J Med**, v.125, p S3–S13, 2012.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; GIBBS, D.L.; NEWELL, V.A.; NAGY, E.; DOBIASOVA, S.; RINALDI, M.; BARTON, R.; VESELOV, A. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the artemis disk antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. **J Clin Microbiol**, v.66, p 515-521, 2008.

PINTO JUNIOR, V.L.; GALHARDO, M.C.G.; LAZÉRA, M.; WANKE, B.; REIS, R. S.; PEREZ, M. Criptococose associada à AIDS. A importância do cultivo da urina no seu diagnóstico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, p. 230-232, 2006.

PINTO-ALPHANDARY, H.; ANDREMONT, A.; COUVREUR, P. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. **Int J Antimicrob Agents**, v.13, p 155-168, 2000.

PRADO M, SILVA MB, LAURENTI R, TRAVASSOS LR, TABORDA CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.104, p 513–521, 2009.

QUEIROZ, J.P.A.F.; et al. Criptococose- uma revisão bibliográfica. **Acta Vet Bras**, 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. **J Bras Patol Med Lab**, v.40, p 293-298, 2004.

REX, J.H.; et al.. Antifungal Susceptibility Testing: Practical Aspects and Current Challenges. **Clin Microbiol Rev**, v.14, p 643-658, 2001.

RIBEIRO, M.A.; NGAMSKULRUNGROJ, P. Molecular characterization of environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in Vitoria, ES, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 50, p 315-320, 2008.

RIPPON, J.W. *Medical mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes*. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 842p, 1982.

RODRIGUES, C.; GAMEIRO, P.; SALETTE, R.; LIMA, J. F. L. C.; CASTRO, B. Spectrophotometric determination of drug partition coefficients in dimyristoyl-l- α -phosphatidylcholine/water: a comparative study using phase separation and liposome suspensions. **Anal Chim Acta**, v. 428, p. 103-109, 2001.

ROSEN, T., LINGAPPAN, A. Rapid treatment of tinea nigra palmaris with ciclopirox olamine gel, 0.77%. **J Am Acad Dermatol**, v.5, p 201-3, 2006.

ROZENBAUM, R.; GONÇALVES, A.J. 1994. Clinical epidemiological study of 171 cases of cryptococcosis. **Clin Infec Dis**, v.18, p 369-80, 1994.

SAKATA, S.; UCHIDA, K.; KAETSU, I.; KITA, Y. 2007. Programming control of intelligent drug releases in response to single and binary environmental stimulation signals using sensor and electroresponsive hydrogel. **Radiat Phys Chem Oxf Engl**, v.76, p 733-737, 2007.

SAMUNI, A. M.; LIPMAN, A.; BARENHOLZ, Y. 2000. Damage to liposomal lipids: protection by antioxidants and cholesterol-mediated dehydration. **Chem Phys Lipids**, v.105, p 121-134, 2000.

SAN-BLAS, G.; BURGER, E. Experimental medical mycological research in Latin America - a 2000-2009 overview. **Rev Iberoam Micol**, v.38, p 1-25, 2011.

SANTOS WR, MEYER W, WANKE B, *et al.* Primary endemic *Cryptococcus gattii* by molecular type VGII in the state of Para, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.103, p 813–818, 2008.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; PONTES, A.; PEREIRA, V. M.; CAETANO, M. N. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. **Int J Pharm**, v. 208, p. 71-80, 2000.

SAR, B.; *et al.* Increasing in vitro resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* Cambodian isolates. **J Antimicrob Chemother**, v.54, p 563-565, 2004.

SEGAL., E.; BAUM, G.L. *Pathogenic yeasts and yeasts infections*. CRC Press: Boca Raton, 1994, 238p.

SEVERO, L.C.; OLIVEIRA, F.M.; SILVA, V.B. Diferenças clínicas, epidemiológicas, e ecológicas entre as duas variedades de *Cryptococcus neoformans*. **Rev Med St Casa Porto Alegre**, v.9, p 1672-1686, 1998.

SHAFFER, C. “Nanomedicine transforms drug delivery”. **Drug Discov Today**, v.10, p 1581-1582, 2005.

SHARMA, A.; SHARMA, U. S. Liposome in drug delivery: progress and limitations. **Int J Pharm**, v.154, p 123-140, 1997.

SIDRIM, J.J.C; ROCHA, M.F.G. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 388p.

SILVA, P.R.; *et al.* Susceptibility to antifungal agents among *Cryptococcus neoformans* varieties isolated from patients at a university hospital. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.41, p 158-162, 2008.

SIONOV E, MENDLOVIC S, SEGAL E. Efficacy of amphotericin B or amphotericin B-intralipid in combination with caspofungin against experimental aspergillosis. **J. Infect**, v.53, p 131-139, 2006.

SOARES, B. M.; SANTOS, D. A.; KOHLER, L. M.; CÉSAR, G. C.; CARVALHO, I. R.; MARTINS, M. A.; CISALPINO, P. S. Cerebral infection caused by *Cryptococcus gattii*: a case report and antifungal susceptibility testing. **Rev Iberoam Micol**, v. 25, p. 242-245, 2008.

SOARES, M. C. B.; PAULA, C. R.; DIAS, A. L. T.; CASEIRO, M. M.; PINTO DA COSTA, S. O. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in city of Santos, SP, Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 47, p. 31-36. 2005.

SOARES, M.M.S.R.; CURY, A.E. In vitro activity of antifungal and antiseptic agents against dermatophyte isolates from patients with *tinea pedis*. **Braz J Microbiol**, v.32, p 130-134, 2001.

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

SORRELL, T.C., CHEN, S.C., RUMA, P., MEYER, W., PFEIFFER, T.J., ELLIS, D.H. and BROWNLEE, A.G. Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. **J Clin Microbiol**, v.34, p 1253-1260, 1996.

SOUZA, L.K.H., FERNANDES, O.F.L., KOBAYASHI, C.C.B.A., PASSOS, X.S., COSTA, C.R., LEMOS, J.A., SOUZA- JUNIOR, A.H. AND SILVA, M.R.R. (2005) Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Goiânia city, Goiás, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.47, p 253–256, 2005.

STAROVA, A.; ALY, R. The safety and efficacy of ciclopirox olamine for the treatment of seborrheic dermatitis. **Expert Opin Drug Saf**, v.4, p 235-9, 2005.

STEENWINKEL, J.E.M.; VIANEN, W.V.; KATE, M.T. T.; VERBRUGH, H.A.; AGTMAEL, M. A.; SCHIFFELERS, R.M.; BAKKER-WOUDENBERG, I.A. J. M. Targeted

drug delivery to enhance efficacy and shorten treatment duration in disseminated *Mycobacterium avium* infection in mice. **J Antimicrob Chemother**, v.60, p 1064–1073, 2007.

TABOADA, J. Systemic Mycoses. **Rev Med Trop**, v.47, p 31-36, 2004.

TAKEUCHI, H.; KOJIMA, H.; YAMAMOTO, H.; KAWASHIMA, Y. Polymer coating of liposomes with a modified polyvinyl alcohol and their systemic circulation and res uptake in rats. **J Control Release**, v.68, p 195-201, 2000.

TAKEUCHI, H.; YAMAMOTO, H.; TOYODA, T.; TOYOBUKU, H.; HINO, T.; KAWASHIMA, Y. Physical stability of size controlled small unilamellar liposomes coated with a modified polyvinyl alcohol. **Int J Pharm**, v.164, p 103-111, 1998.

TAY ST, LIM HC, TAJUDDIN TH, *et al.* Determination of molecular types and genetic heterogeneity of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* in Malaysia. **Med Mycol**, v.44, p 617–622, 2006.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carrier. **Nature Rev Drug Discov**, v.4, p 145-160, 2005.

TRILLES, et al. Regional pattern of the molecular type of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.5, p 455–462, 2008.

URBANI, L.; SHERWOOD, S.W.; SCHIMKE, R.T. 1995. Dissociation of nuclear and cytoplasmic cell cycle progression by drugs employed in cell synchronization. **Exp Cell Res**, v.219, p 159-168, 1995.

VANDEPUTTE, J.; WACHTEL, J.L.; STILLER, E.T. 1956. Amphotericin A and B antifungal antibiotics produced by a *Streptomyces*. II The isolation and properties of the crystalline amphotericins. **Antibiot Annu**, v.1955-1956, p 587-591, 1956.

VILCHEZ, R.A.; FUNG, J.; KUSNE, S. Cryptococcosis in a organ transplant recipients: an overview. **Am J Transplant**, v.2, p 575-580, 2002.

WAGNER, V.; et al. The emerging nanomedicine landscape. **Nature Biotechnology**, v.24, p 1211-1217, 2006.

WALSH, T. J.; et al. Safety, tolerance, and pharmacokinetics of high-dose liposomal amphotericin B (AmBisome) in patients infected with *Aspergillus* species and other filamentous fungi: maximum tolerated dose study. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45, p 3487–3596, 2001.

WALSH, T.J.; et al. Correlation between *in vitro* and *in vivo* antifungal activities in experimental fluconazole-resistant oropharyngeal and esophageal candidiasis. **J Clin Microbiol**, v.38, p 2369-2373, 2000.

WANG, J.L., CHANG, C.H., YOUNG-XU, Y., CHAN, K.A. Systematic review and meta-analysis of the tolerability and hepatotoxicity of antifungals in empirical and definitive therapy for invasive fungal infection. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.54, p 2409-2419, 2010.

WEIG, M.; REICHARD, U.; GROB, U. 2001. *Aspergillus fumigatus*-virulence and opportunism. **Mycoses**, v.44, p 351-355, 2001.

WEIR, S.J.; PATTON, L.; CASTLE, K.; RAJEWSKI, L. KASPER, J.; SCHIMMER, A.D. The repositioning of the antifungal agent ciclopirox olamine as a novel therapeutic agent for the treatment of haematologic malignancy. **J Clin Pharm Ther**, v.36, p 128-134, 2011.

WENGENACK, N. L.; BINNICKER, M. J. Fungal molecular diagnostics. **Clinics in Chest Medicine**, v. 30, p. 391-408, 2009.

WICKES, B.L.; KNOW-CHUNG, K.J. Genetic basis of pathogenicity in *Cryptococcus neoformans*, p. 25-49. In: *Fungal Pathogenesis: Principles and Clinical Applications*. Marcel Dekker, New York, p. 762, 2002.

WILES, S.; WILLIAM, P.H.; FRANKEL, G.; ROBERTSON, B. Modelling infectious disease time to think outside the box. *Nat Rev Microbiol*, London, 4(4):307-312, 2006.

WINN, W. C.; KONEMAN, E. W. *Koneman: Diagnóstico Microbiológico texto e atlas colorido*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008. 1535, 30 p.

WU, T.C. On the development of antifungal agents: perspective of the U.S. Food and Drug Administration. **Clin Infect Dis**, v.19, p 54-58, 1994.

YOSHIZAWA,Y.; KONO, Y.; OGAWARA, KEN-ICHI; KIMURA T.; HIGAKI, K. PEG liposomalization of paclitaxel improved its in vivo disposition and anti-tumor efficacy International Journal of Pharmaceutics 412:132–141, 2011.

ZAITS, C.; et al. 1998. *Compêndio de Micologia Médica*. 1.ed. Rio de Janeiro: Medsi Editora Médica e Científica, 434p.

ZANINI, M., MARTINS, E.L., LACAZ, C.S. Úlcera como primeira manifestação de criptococose sistêmica em paciente aids. **Med Cutan Iber Lat Am**, v.29, p 92-6, 2001.

ZARAGOSA O. et al. The polysaccharide capsule of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* enlarges by distal growth and is rearranged during budding. **Mol Microbiol** v.59; p 67-83, 2006.

ZHANG, A.Y.; CAMP; W.L.; ELEWSKI, B.E. Advances in topical and systemic antifungals. **Dermatologic clinics**, v.25, p 165-183, 2007.

ZHANG, L.; GRANICK, S. How to stabilize phospholipid liposomes (using nanoparticles). **Nano Letters**, v.6, p 694-698, 2006.

ZHANG, L.; et al. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. **Clin Pharm Ther**, v.83, p 761-769, 2008.

ZHANG, L.; PORNPATTANANANGKUL, D.; HU, C. M. J. et al. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. **Curr Med Chem**, v.17, p 585-594, 2010.

ZHU, LI-PING; SHI, YAO-ZHONG; WENG, XIN-HUA; MULLER, F.M.C. Case Reports. Pulmonary Cryptococcosis associated with Cryptococcal Meningitis in non-AIDS Patients, **Mycoses**, v.45, p 111–117, 2002.

4- CAPÍTULO 1

(A ser submetido à revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*)

**Antifungal activity of cyclopirox olamine-loaded liposomes against
*Cryptococcus neoformans***

Patrícia C. Oliveira^{a,b}; Rejane P. Neves^a; Pabyton G. Cadena^b; Isabella M. F. Cavalcanti^b;
Soares, P.H.S.; Nereide S. Santos-Magalhaes^{b,*}

^a Laboratório de Micologia Médica, Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Cidade Universitária, Av. Moraes Rego s/n, 50670-910, Recife, Brazil.

^b Laboratório de Imunopatologia Keiso-Azami, UFPE, Recife, Brazil.

*Corresponding author

Prof. Nereide Stela Santos-Magalhães

Universidade Federal de Pernambuco

Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA)

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife-PE, Brazil.

Phone: + 55 81 21268587; Fax: +55 81 21268485

E-mail: nereide.magalhaes@gmail.com

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the *in vitro* antifungal activity of ciclopirox olamine (CPO) in its free and encapsulated liposomal forms against clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. The liposomes were prepared with soybean phosphatidylcholine (PC), cholesterol (CH) and stearylamine (SA), and distearoylphosphatidylethanolamine-polyethylene glycol for stealth liposomes. For optimization of drug/lipid ratio and liposome stability, a 2^{4-1} fractional factorial design was carried out with mean particle size, polydispersity index (PDI) and CPO encapsulation efficiency (EE%) used as variables. *In vitro* kinetics was conducted to evaluate the release profiles of CPO from conventional and stealth liposomes. Antifungal susceptibility testing of CPO was evaluated on thirty clinical isolates of *C. neoformans* according to CLSI. The results of the factorial design of liposomes showed a typical formulation presenting remarkable improvement of 25% in CPO amount (9.25 mM; EE%=97.36± 0.10). The particle size of 102 nm and PDI of 0.274 were found. Kinetics showed a more controlled release profile of stealth liposomes as compared with conventional liposomes. *C. neoformans* strains were susceptible to CPO with fungistatic (0.3 and 0.61 µg/mL) and fungicidal activity (1.22 and 4.88 µg/mL). Five *C. neoformans* strains (5811, 5813, 5824, 5825 and 124) were susceptible to CPO encapsulated in liposomes with fungistatic and fungicidal activities of 1.22 µg/mL. The results suggest that CPO loaded-liposomes have significant antimycotic activity against *Cryptococcus* spp, reinforcing its potential for *in vivo* studies and its application in cryptococcosis treatment.

Keywords: Ciclopirox olamine, cryptococcosis, *Cryptococcus neoformans*, liposomes, kinetics, antifungal activity.

1. Introduction

Despite the widespread prophylactic use of antifungal agents, infections caused by *Cryptococcus* spp. have increased mortality and morbidity in immunocompromised patients (1, 2). The treatment of invasive cryptococcosis with commercially available drugs such as amphotericin B and fluconazole has been limited, especially because of their toxicity associated with the emergence of resistant *Cryptococcus* isolates (3-7).

The treatment of choice of disseminated fungal infections in immunocompromised patients is the Amphotericin B (AmB) in sodium deoxycholate (Fungizone[®]), despite its nephrotoxicity (8). The currently strategies used to overcome this issue are lipid formulations of AmB including liposomes (AmBisome[®]), AmB-lipid complex (Abelcet[®]) and AmB colloidal dispersion (Amphocil[®]), which have been developed to enhance the therapeutic index and to reduce the nephrotoxic side effects of amphotericin B (9-11). However, these lipid based AmB dosage forms are not stealth formulations.

In this scenario, hydroxypyridone derivates have been synthesized and evaluated for monitoring superficial fungal infections. Among these agents, ciclopirox olamine (CPO) [(6-Cyclohexyl-1-hydroxy-4-methylpyridin-2(1*H*)-one and 2-aminoethanol)] (Fig. 1) is the most broadly used in clinical applications because of its broad spectrum, no toxicity, low cost and high potency. It has a broad spectrum against bacterial and fungal species, inhibiting nearly all clinical relevant dermatophytes and yeasts, including *Malassezia* species and the frequently azole-resistant *Candida* isolates (12, 13). However, antifungal activity of ciclopirox olamine-loaded pegylated liposomes against *Cryptococcus* spp. strains has not been performed yet.

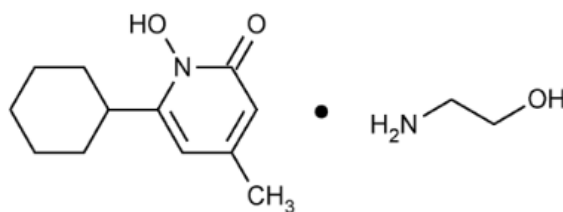


Fig.1. Chemical Structure of 6-Cyclohexyl-1-hydroxy-4-methylpyridin-2(1*H*)-one and 2-aminoethanol.

To overcome the low bioavailability and short half-life time (2.1 h) of ciclopirox olamine [13], the liposomal formulations are proposed to allow CPO systemic use. The present study, thus, aims to develop and characterize CPO-loaded liposomes, as well as to

evaluate its *in vitro* antifungal activity against thirty *Cryptococcus* clinical isolates obtained from the cerebrospinal fluid of immunocompromised patients.

Based on these findings, herein, we describe the *in vitro* antifungal activity of CPO encapsulated in conventional and stealth liposomes. Indeed, the preparation and the characterization of CPO-loaded liposomes was performed using experimental fractional design, as well as the *in vitro* kinetic studies of these liposomal formulations were carried out.

2. Material and methods

Reagents. Soya phosphatidylcholine (PC), distearoylphosphatidylethanolamine-polyethylene glycol 2000 (DSPE-PEG2000) were supplied by Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). Cholesterol (CH), stearylamine (SA), ciclopirox olamine (97% purity), Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) and morpholine-propanesulfonic acid (MOPS) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, US). Sabouraud dextrose agar medium (SDA) was obtained from Difco (Detroit, US). Microtiter plates were furnished by TPP (Trasadingen, Switzerland) and 0.22- μ m membranes were purchased from Millipore (Darmstadt, Germany). All chemicals were of reagent grade.

***Cryptococcus* strains.** The experimental protocol was previously approved by the Ethical Committee of the Human Care and Use of the Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil (#080/09). Thirty clinical strains of *Cryptococcus neoformans* were isolated from 300 samples of cerebro spinal fluid (CSF) of immunocompromised patients obtained by lumbar punctures at the Pernambuco Neurological Diagnosis Service. The clinical samples were processed for mycological diagnosis using standard methods, direct examination with China ink staining and isolation in culture, at the Medical Mycology Laboratory, UFPE, Brazil. Cultures were prepared in duplicate using SDA medium with chloramphenicol (50 mg/mL) and incubated at $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ or $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ in an aerobic atmosphere for 5 days. Pure cultures were transferred onto the surface of SDA for taxonomic identification (14, 15).

Preparation of ciclopirox olamine-loaded liposomes. Ciclopirox olamine was encapsulated in conventional (CPO-Lipo C) and stealth liposomes (CPO-Lipo S) were prepared using the dried-lipid film hydration method (16). Initially, a pre-formulation study was carried out using PC, CH and SA at 7:2:1 molar ratio, with total lipid concentrations varying from 37.3 mM to 117.6 mM, drug:lipid ratio ranging from 1:50 to 1:317, and CPO concentrations at 1-2 mg/mL. Stealth liposomes were prepared by replacing 5% of PC for DSPE-PEG2000. From the pre-formulation studies, a two-level 2^{4-1} experimental fractional design was carried out to optimize the CPO encapsulation in liposomes evaluating the

influence of lipid concentrations and drug:lipid molar ratio on the variables mean particle size, polydispersity index (PDI) and drug encapsulation efficiency (EE%). The factors were defined as follows: Factor A = PC (41.16, 61.74 and 82.32 mM); Factor B = CH (11.76, 23.52 and 35.28 mM); Factor C = SA (0.0; 5.88 and 11.76mM) and Factor D = CPO (2.0; 2.5 and 3.0 mg). Experiments were randomly assayed in order to nullify the effect of inappropriate nuisance variables. The central point was employed in triplicate.

Characterization and physicochemical evaluation of CPO-LIPO. The physicochemical analysis was carried out after preparation of liposomes. Parameters such as the macroscopic appearance, morphological examination, particle mean diameter, pH changes, CPO content and encapsulation efficiency were analyzed. To determine CPO content an aliquot of liposomes (20 μ L) was diluted with methanol to 5 mL and then sonicated for 5 minutes. Measurements were carried out at 304 nm (13) using a CPO standard curve with concentrations varying from 5 to 80 μ g/mL. Drug-encapsulation efficiency of CPO in liposomes was determined by the ultrafiltration/ultracentrifugation technique using Ultrafree® units (Millipore, USA). After centrifugation of the CPO-Lipo samples (Ultracentrifuge KT 20000, Kubota, Japan) at 8.776 *g* for 1 h at 4 °C, the CPO concentration in the supernatant was also measured at 304 nm and the CPO encapsulation ratio calculated in relation to its initial content in the liposome formulation.

***In vitro* release kinetics of CPO from convencional and stealth liposomes.** The *in vitro* release kinetics of CPO from conventional and stealth liposomes were carried out using the dialysis technique under sink conditions at pH 7.4 phosphate buffer solution at 37°C. Briefly, an aliquot of the liposomal formulation (1 mL) containing CPO was inserted into a dialysis membrane bag (MW cut-off 12,400), which was subsequently sealed and suspended in the release medium (50 mL). The system was maintained under magnetic stirring at 37°C. At appropriate intervals, samples of the release medium (1 mL) were removed and assessed for CPO content. At each withdraw the release medium was replaced by fresh phosphate buffer solution (1 mL).

Antifungal susceptibility testing. Antifungal activity of CPO against *Cryptococcus* strains was determined according to CLSI (guide M27-A3) with some modifications (18). The culture medium RPMI 1640 with L-glutamine, without sodium bicarbonate (pH 7.0 $\pm$ 0.1) and supplemented with MOPS (0.165 mol⁻¹), was filter-sterilized in 0.22 μ membranes (Millipore, Darmstadt, Germany). Stock solutions of CPO diluted in DMSO at concentrations of 1600 mg/mL were prepared. The concentrations of CPO in solution or in conventional and stealth liposomes ranged from 0.3 to 625 μ g/mL.

The *Cryptococcus* strains were maintained on SDA medium and incubated for 48h. Suspensions of the isolates were prepared and their density was adjusted according to the 0.5 MacFarland scale for 90% transmission using a spectrophotometer. The volume of the inoculum was adjusted with sterile saline to 5.0 mL and was then diluted in RPMI 1640 to attain a concentration of $2-5 \times 10^3$ cells/mL.

For the susceptibility tests, sterilized flat-bottomed 96-well microtiter plates were used and the procedures followed the CLSI protocols [17,18]. The inoculum was added to the wells with the tested drug, and the plates were incubated at 35°C for 3 days before reading the results to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of the CPO. The microorganism growth inhibition was evaluated by visual observation. *Candida parapsilosis* (ATTC 22019) and *Candida krusei* (ATCC 6528) strains were used as quality controls.

The minimal inhibitory concentration (MIC) values of CPO against *C. neoformans* were determined as the concentration able to inhibit fungal growth $\geq 80\%$ [17]. To determine the minimal fungicide concentration (MFC) of CPO the content of the well that showed 80% and 100% fungal growth inhibition was transferred onto SDA in Petri dishes. The dishes were then incubated at 35°C for 3 days to determine the fungal viability. The MFC was confirmed by the absence of fungal growth. The CPO activity was determined according to the CLSI document M27-A3 [18] based on the susceptibility range of AmB (≤ 1 $\mu\text{g/mL}$), which is the drug reference. In addition, the evaluation was also based on the new CLSI document M38-A2 [17], which includes tests with CPO for dermatophytes, suggesting that MICs ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$ are considered susceptible. Each experiment was performed in duplicate.

Statistical analysis. Statistical analysis of data of stealth and conventional liposomes formulations was carried out using the Tukey's Multiple Comparison test with a significance level defined as $p < 0.05$. Data were analyzed using Statistica 8.0[®] software (Statsoft Inc, Tulsa, OK, USA) and GraphPad Prism 4[®] (GraphPad software, California, US).

3. Results

Pre-formulation study of CPO-loaded liposomes. Different batches of CPO-loaded liposomes were presented in the pre-formulation study, presenting mean size diameter and PDI ranging from 97.3 nm to 156 nm and 0.293 to 0.360, respectively (Table 1). After preparation, liposomal formulations exhibited a bluish reflection characteristic of small unilamellar vesicles, independently of the encapsulated CPO concentration (1–2 mg/mL). Liposomes presented CPO encapsulation efficiency ranging from $89.65 \pm 0.10\%$ to $99.75 \pm 0.51\%$, calculated using the standard curve of CPO concentrations ranging from 5 to 80

$\mu\text{g/mL}$ ($\text{Abs}=0.0252[\text{CPO}] - 0.0286$; $r^2= 0.9994$). A typical CPO-loaded liposomal formulation (L4) was obtained with a 1:79 drug/lipid molar ratio (CPO=7.4 mM: PC:CH:SA= 41.16:11.76:5.88), EE% of $99.6 \pm 0.21\%$, particle size of 123 nm and PDI of 0.312. The others liposome formulations were unstable, exhibiting drug precipitation and lipid flocculation after one week of preparation. The formulation L4 was chosen for further fractional factorial design.

Fractional Factorial design. Eleven runs of two-level 2^{4-1} fractional experimental design and their responses are shown in Table 2. The variable PC concentrations at higher levels (61.74 and 82.32 mM) reduced the mean size (from 156 to 90.5 nm). The higher CH concentrations reduced the mean size (from 154 to 133 nm) and EE% (from 95.8 ± 0.45 to 93.6 ± 0.98), however, increased the PDI values from 0.319 to 0.472 of the liposomes. The enhancement of SA concentrations (5.88 and 11.76) increased the mean size (from 90.5 to 119 nm) and PDI values (from 0.274 to 0.301) and reduced EE% from $98.7 \pm 0.97\%$ to $89.7 \pm 0.2\%$. But the absence of SA induced drug precipitation after 48 h of storage at 4°C of formulations. Finally, the higher CPO concentrations (11.1 mM) reduced the EE% (from $95.56 \pm 0.45\%$ – $90.56 \pm 0.31\%$).

Based on factorial results, the formulations of the central point presented stability with the lowest values of the mean size diameter 102.7 nm, PDI 0.264 and EE% of 97.36% (L11) (Fig. 2, Table 2). This formulation was chosen to prepare stealth liposomes using DSPE-PEG2000. The stealth liposomes present a mean size diameter, PDI, EE% values of 101.4 ± 0.74 nm, 0.307 and $96.45 \pm 0.89\%$, respectively.

No statistical difference was found between physicochemical parameters (mean particle size, PDI and drug encapsulation efficiency) of conventional (L11) and stealth (L11') liposomes formulations by the Turkey Test ($p < 0.05$).

Kinetics of CPO-loaded in conventional and stealth liposomes. A slower release pattern of CPO from the stealth liposomal formulation was found when compared with the conventional liposomes (Fig. 3). The release profile from CPO-loaded conventional and stealth liposomes showed burst effects of 65.95 ± 0.5 and $41.09 \pm 0.3\%$, respectively, after the first 2h. The maximum release and the release rate of CPO from conventional and stealth liposomes at 96 h were approximately $99.9 \pm 0.6\%$ and $94.6 \pm 0.3\%$; 634.2 ± 0.0 $\mu\text{g/mL}$ and 109.02 ± 2.8 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

Antifungal activity of CPO-loaded liposomes. All the analyzed *Cryptococcus* strains were susceptible to CPO with fungistatic concentrations ranging from 0.30 to 0.61 $\mu\text{g/mL}$ and fungicidal activity from 1.22 to 4.88 $\mu\text{g/mL}$ (Table 3). On the other hand, the conventional

and stealth CPO-loaded liposomes had the same fungistatic activity with MIC values ranging from 1.22 to 2.44 $\mu\text{g/mL}$, and fungicidal activity between 1.22 and 9.76 $\mu\text{g/mL}$. Moreover, five *C. neoformans* strains (5811, 5813, 5824, 5825 and 6897) were more susceptible to CPO encapsulated in liposomes with fungistatic and fungicidal activities of 1.22 $\mu\text{g/mL}$.

4. Discussion

Cryptococcosis, a mycosis caused by *Cryptococcus* spp, is one of the most important HIV-related opportunist fungal infections (7). High rates of fungal persistence and recurrence caused growing concern among physicians about the potential emergence of resistance of capsulated yeasts (6).

The micellar suspension of amphotericin B (AmB) with sodium desoxycholate (Fungizone®) is the antifungal agent of choice for the treatment of cryptococcosis. It can be notice that both activity and the toxicity of AmB are related to its structure and tendency to form pores in ergosterol-containing membranes, leading to toxicity towards host cells (8). In the literature, several studies have been proposed the encapsulation of antibacterial and antifungal agents in drug delivery systems, particularly liposomes, due to their ability to reduce drug toxicity and improve their therapeutic index (19-21).

In this study it was possible to evaluate the *in vitro* antifungal activity of free CPO and encapsulated into conventional and stealth liposomes. The mean size, index polydispersity and drug encapsulation efficiency as well as the lipid constituents of the liposomes were evaluated, given that these parameters are prominent aspects for drug delivery effectiveness (22).

The antifungal drug used in this work, CPO is a broad-spectrum agent used in the treatment of topical fungal infections. Nevertheless CPO systemic use is limited due to its short half-life time of 2.1 h (13, 23). To the best of our knowledge, no previous report on the improvement of systemic delivery systems containing ciclopirox olamine was found. In order to rise above these issues and improve the CPO bioavailability the use of liposomes as nanocarriers for systemic administration was proposed in the present study.

Ciclopirox olamine-loaded liposomes (CPO-Lipo) were previously developed using the dried-lipid film hydration method by varying drug concentrations from 1 to 2 mg/mL. CPO-Lipo were characterized with respect to macroscopic appearance, mean size diameter, polydispersity index and encapsulation efficiency from the initial formulation (L1) with concentrations of PC=82.32, CH=23.52, SA=5.88 and 1 mg/mL of CPO (Table 1). According to the pre-formulation study, the L4 formulation prepared with 117,6 mM of lipids (PC=82.32, CH=23.52, SA=11.76) was chosen as a typical CPO liposomal formulation for having

better physicochemical aspect, no drug precipitation, greater amount of drug encapsulated (2 mg/mL) and encapsulation efficiency of $99.6 \pm 0.01\%$. The others formulations showed drug precipitation up to seven days after preparation. In addition, CPO-loaded liposomes without stearylamine were equally unstable (L7 formulation). From the L4 formulation, a 2^{4-1} fractional factorial design was carried out to verify the influence of the lipid concentrations and the positively charged lipid, stearylamine, on the stability and drug entrapment efficiency of liposomes (Table 2). Despite of the central point of the factorial design have increased the total lipids amount in 35.52%, it showed prominent characteristics when compared with the L4 formulation with improvement of the mean size in 17.1%, PDI in 15.34% and CPO amount in 25%. The minimum concentrations of stearylamine to obtain the stable formulation for one month was 5.88 mM.

To develop a therapeutically efficient nanocarrier system, the constituents of liposomes has to be optimized because it is the crucial factor in preparing stable liposomes incorporated by maximum of drug concentration. The use of a 2^{4-1} fractional factorial design can considerably reduce the number of preparations. In our study, the factors content of PC, CH, SA were examined at two levels. Cholesterol is often used as a main component of the lipid membrane. It has been shown to modify the order and mobility of the phospholipids in the bilayer and as a consequence, it alters the bilayer fluidity (24). According to Shaikh and Pawar (25) the amounts of CH are primarily responsible for the stability of topic liposomes containing CPO. SA liposomes have previously demonstrated efficacy in animal models for human diseases and are currently being evaluated in human clinical studies. However, toxic effects have also been reported for SA liposomes (26). In our study, it was observed that high SA concentrations result in unstable liposomes. The amount of SA was maintained to a minimum concentration after the fractional factorial designer (5.88 mM).

Recently, the design of CPO-loaded liposomes to enhance availability of this drug in cutaneous mycosis treatment was reported by Shaikh; Pawar (25). In this previous study spherical unilamellar, CPO-lipo were obtained using a method based on ethanol injection. The vesicles size and drug entrapment efficiency ranged from 196 ± 1.73 nm to 1040.66 ± 7.02 nm and from $34.28 \pm 4.4\%$ to $54.89 \pm 1.9\%$, respectively. The method used by these authors is not applicable for systemic use due to high particle size and low drug entrapment efficiency. In our study, the liposome formulations presented after experimental design a vesicle size ranging from 90.5 ± 0.96 nm to 189.1 ± 4.50 nm and % entrapment efficiency ranging from $89.56 \pm 0.47\%$ to $98.75 \pm 0.51\%$.

Based on the results of the 2^{4-1} fractional factorial design, the lipids concentrations obtained from the central point were used for stealth liposome preparation. The results indicated that there is no statistical difference between conventional and stealth formulations on the physico-chemical parameters by the Turkey Test ($p < 0.05$).

From the prominent formulation observed on the experimental designer, kinetic release was carried out *in vitro* using conventional and stealth systems for comparison. Comparing the release kinetic of CPO-loaded conventional and stealth liposomes, the both systems presented a released profile in a controlled manner, however, it was observed that stealth liposomes showed considerable decrease in the CPO release profile, probably due to the presence of PEG, so the stealth liposomes perhaps may be effective in the treatment of cryptococcosis avoiding repeated doses and adverse effects (27).

Regarding biological activity, the antifungal testing was realized with both conventional and stealth liposomes from the central point formulation of the experimental designer. It has been established that the *in vitro* activity of CPO occurs against a broad spectrum of fungi, including pathogenic yeasts. Furthermore, free CPO can be considered both fungistatic and fungicidal with MICs ranging from 0.9 to 3.9 $\mu\text{g/mL}$ for *Candida* species such as *Candida albicans* and *C. glabrata*. The MIC range of pathogenic yeast including *Cryptococcus* strains and dermatophytes is between 0.25 and 31.3 $\mu\text{g/mL}$ (7, 12, 28, 29, 30). Hannel et al. (31) using a non-reference method, obtained the antifungal activity of CPO around 6 $\mu\text{g/mL}$. The MICs values obtained from our data with free CPO are lower than those reported in literature with concentrations ranging from 0.30 to 0.61 $\mu\text{g/mL}$.

According to the reference method (17), dermatophytes are considered sensitive to CPO when MICs are $\leq 1 \mu\text{g/mL}$. Regarding *Cryptococcus* strains, only one research focus on the antifungal activity of CPO was performed according to CLSI protocol (7). In the present study, all the thirty tested strains presented MICs $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ and were considered sensitive to CPO treatment.

With respect to free CPO fungicidal activity, thirty *Cryptococcus* isolates showed fungicidal concentrations of 1.22, 2.44, 4.88 $\mu\text{g/mL}$. Oliveira et al. (7) working with sixteen *Cryptococcus* isolates also observed similar results with fungicidal activity of CPO free in concentrations from 1 to 4 $\mu\text{g/mL}$.

Regarding the conventional and stealth CPO-loaded conventional and stealth liposomes, no difference in terms of *in vitro* fungistatic activity was observed. The MICs varied between 1.22 and 2.44 $\mu\text{g/mL}$. Despite drugs routinely used in clinical practice for cryptococcosis treatment such as amphotericin B and Fluconazole, exhibit MIC values lower than the MICs

observed in our study, these drugs showed some disadvantages due to side effects such as hypertension, nausea, gastrointestinal intolerance, hepatotoxicity and nephrotoxicity (32, 33). Furthermore, Fluconazole is an antifungal drug which shows only fungistatic activity and our liposomes showed both fungistatic and fungicidal activity with MFC/MIC $\leq 9.76 \mu\text{g/mL}$. Several reports described liposomes as a drug delivery tool in experimental models of cryptococcal infections (34-38).

It is also possible to observed in our study that the most MIC and MFC of CPO-loaded conventional and stealth liposomes (1.22 to 2.44 $\mu\text{g/mL}$ and 1.22 to 9.76 $\mu\text{g/mL}$, respectively) showed promising values when compared with those obtained by Ambisome[®] against clinical *Cryptococcus neoformans* isolates with MIC and MFC values of 8 and $> 8 \mu\text{g/mL}$, respectively (39).

The present study shows a prospective application of the CPO-loaded liposomes for the management of AIDS-associated cryptococcal meningitis, although this drug show low bioavailability. Thus, the liposomes may overcome these limitations of the CPO in a free form and improve its antifungal activity. The ciclopirox olamine liposomal formulation is an interesting approach to afford commercially available efficient antifungal systems. Although CPO-loaded liposomes exhibited excellent *in vitro* antifungicidal activity, further *in vivo* experiments are still required to consider this drug as promising treatment option for cryptococcosis. These experiments are being performed by our research group.

Acknowledgments

We thank the Brazilian Council for Scientific and technological Development (CNPq) for financial support and the grant fellowship of the first author.

References

1. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. 2009. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*. 23:525–530.
2. Albuquerque PC, Rodrigues ML. 2012. Research trends on pathogenic *Cryptococcus* species in the last 20 years: a global analysis with focus on Brazil. *Future Microbiol*. 7:319–329.

3. Joseph-Horne T, Loeffler RST, Hollomon DW, Kelly SL. 1996. Amphotericin B resistant isolates of *Cryptococcus neoformans* without alteration in sterol biosynthesis. J. med. vet. Mycol. **34**:223–225.
4. **Lozano-Chiu M, Paetznick VL, Ghannoum MA, Rex JH.** 1998. Detection of resistance to amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* clinical isolates: performances of three different media assessed by using E-test and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A methodologies. J. Clin. Microbiol. **36**:2817–2822.
5. **Sar B, Monchy D, Vann M, Chantary K, Sarthou JL, Buisson Y.** 2004. Increasing in vitro resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* Cambodian isolates. J. Antimicrob. Chemother. **54**:563-565.
6. **Cowen LE, Steinbach WJ.** 2008. Minireviews: stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. Eukaryot Cell **7**:747–764.
7. **Oliveira PC, Medeiros CS, Macedo DP, Andrade SL, Correia MT, Mesquita SD, Lima-Neto RG, Neves RP.** 2010. Ciclopirox olamine: an antifungal alternative against cryptococcosis. Lett. Appl. Microbiol. **51**:485-9.
8. **Labari M, Gulik A, Dedjeu LP, Legrand P, Barratt G, Cheron M.** 2004. New lipid formulation of amphotericin B: spectral and microscopic analysis. Biochim Biophys Acta **1664**:172-181.
9. **Sionov E, Mendlovic S, Segal E.** 2006. Efficacy of amphotericin B or amphotericin B-intralipid in combination with caspofungin against experimental aspergillosis. J. Infect. **53**:131-139.
10. **Nahar M, Pharm M, Mishra D, Dubey V, Jain NK.** 2008. Development, characterization, and toxicity evaluation of amphotericin B-loaded gelatin nanoparticles. Nanomedicine **4**:252–261.
11. **Wang JL, Chang CH, Young-Xu Y, Chan KA.** 2010. Systematic review and meta-analysis of the tolerability and hepatotoxicity of antifungals in empirical and definitive therapy for invasive fungal infection. Antimicrob. Agents Chemother. **54**:2409-2419.
12. **Niewerth M, Kunze D, Seibold M, Shaller M, Korting HC, Hubel B.** 2003. Ciclopirox Olamine treatment affects the expression pattern of *Candida albicans* genes encoding virulence factors, iron metabolism proteins, and drug resistance factors. Antimicrob. Agents Chemother. **47**:1805–1817.
13. **Coppi G, Silingardi S.** 1992. HPLC method for pharmacokinetic studies on ciclopirox olamine in rabbits after intravenous and intravaginal administrations. Farmaco **47**:779-786.

14. **Barnett JA, Paine RW, Yarrow D.** 2000. Yeasts: Characteristics and Identification, 3 edn. Cambridge: Cambridge- University Press.
15. **De Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ.** 2000. Atlas of Clinical Fungi. 2nd edn. Centraalbureau voor Schimmelcultures: Universitat Rovira Virgili.
16. **Cavalcanti IMF, Mendonça EAM, Lira MCB, Honrato SB, Camara CA, Amorim RVS, Filho, J M, Rabello MM, Hernandez MZ, Ayala AP, Santos-Magalhães NS.** 2011. The encapsulation of b-lapachone in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex into liposomes: A physicochemical evaluation and molecular modeling approach. Eur. J. Pharm. Sci. **44**:332-40.
17. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi (M38-A2). 2 ed. Wayne, PA, USA.
18. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2008. Reference method for broth dilution Antifungal susceptibility testing of yeasts (M27-A3). 3rd edn. Wayne: USA.
19. **Adler-Moore JP, Olson JA, Proffitt RT.** 2004 Alternative dosing regimens of liposomal amphotericin B (Ambisome) effective in treating murine systemic candidiasis. J. Antimicrob. Chemother. **54**:1096-1102.
20. **Rukholm G, Mugabe C, Azghani AO, Omri A.** 2006. Antibacterial activity of liposomal gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa*: a time-kill study. Int. J. Antimicrob. agents **27**:247-252.
21. **Nicolosi D, Scalia M, Nicolosi VM, Pignatello R.** 2010. Encapsulation in fusogenic liposomes broadens the spectrum of action of vancomycin against Gram-negative bacteria. Int. J. Antimicrob. Agents **35**:553-558.
22. **Bakker-Woudenberg IAJM.** 2002. Long-circulating sterically stabilized liposomes as carries of agents for treatment of infection or for imaging infectious foci. Int. J. Antimicrob. Agents **19**:299-311.
23. **Nogueiras-Nieto L, Sobarzo-Sánchez E, Gómez-Amoza JL, Otero-Espinar FJ.** 2012. Competitive displacement of drugs from cyclodextrin inclusion complex by polypseudorotaxane formation with poloxamer: Implications in drug solubilization and delivery. Eur. J. Pharm. Biopharm. **80**:585-95.
24. **Braun E, Wagner A, Furnschlief E, Katinger H, Vorauer-Uhl, K.** 2006. Experimental design for in vitro skin penetration study of liposomal superoxide dismutase. J. Pharm. Biomed. Anal. **40**:1187–1197.

25. **Shaikh KS, Pawar AP.** 2010. Liposomal delivery enhances cutaneous availability of Cyclopirox olamine. *Lat. Am. J. Pharm.* **29**:763-70.
26. **Nishiya T, Lam RT, Enq F, Zerey M, Lau S.** 1995. Mechanistic study on toxicity of positively charged liposomes containing stearylamine to blood. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **23**: 505-512.
27. **Yoshizawa Y, Kono Y, Ogawara K, Kimura T, Higaki K.** 2011. PEG liposomalization of paclitaxel improved its in vivo disposition and anti-tumor efficacy. *Int. J. Pharm.* **412**:132-141.
28. **Dittmar W, Lohaus G.** 1973. HOE 296, a new antimycotic compound with a broad antimicrobial spectrum: laboratory results. *Arzneimittelforschung* **23**:670-674.
29. **Figueiredo VT, Santos DA, Resende MA, Hamdan JS.** 2007. Identification and in vitro antifungal susceptibility testing of 200 clinical isolates of *Candida* spp. responsible for fingernail infections. *Mycopathologia* **164**:27–33.
30. **Biancalana FSC, Telles PFG, Lyra L, Zaninelli A.** 2008. Preanalytical conditions for broth microdilution antifungal susceptibility of *Microsporium* spp. *Mycoses* **51**:313–317.
31. **Hannel H, Roether W, Dittmar W.** 1988. Evaluation of the fungicidal action of in vitro and in a skin model considering the influence of penetration kinetics on various standards antimycotics. *Ann. NY Acad. Sci.* **544**:329–337.
32. **Pathak A, Pien FD, Carvalho L.** 1998. Amphotericin B use in a community hospital, with special emphasis on side effects. *Clin. Infect. Dis.* **26**:334-338.
33. **Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT.** 2012. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. *Int. J. Microbiol.* doi: [10.1155/2012/713687](https://doi.org/10.1155/2012/713687).
34. **Sharkey PK, Graybill JR, Johnson ES, Hausrath SG, Pollard RB, Kolokathis A, Mildvan D, Fan-Havard P, Eng RH, Patterson TF, Pottage JC, Simberkoff MS, Wolf J, Meyer RD, Gupta R, Lee LW, Gordon DS.** 1996. Amphotericin B complex compared with amphotericin B in the treatment of cryptococcal meningitis in patients with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* **22**:315-321.
35. **Leenders AC, Reiss P, Portegies P, Clezy K, Hop WC, Hoy J, Borleffs JC, Allmorth T, Kauffmann RH, Jones P, Kroon FP, Verbrugh HA, Marie S.** 1997. Liposomal amphotericin B (Ambisome) compared with amphotericin B both followed by oral fluconazole in the treatment of AIDS-associated cryptococcal meningitis. *AIDS* **11**: 1463-1471.

36. **Clemons KV, Stevens DA.** 1998. Comparison of Fungizone, Amphotec, AmBisome, and Abelcet for Treatment of Systemic Murine Cryptococcosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 899–902.
37. **Baddour LM, Perfect JR, Ostrosky-Zechener I.** 2005. Successful use of amphotericin B lipid complex in the treatment of cryptococcosis. *Clin. Infect Dis.* **40**:409-413.
38. **Khan MA, Nasti TH, Owais M.** 2005. Incorporation of amphotericin B in tuftsin-bearing liposomes showed enhanced efficacy against systemic cryptococcosis in leucopenic mice. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**:726–731.
39. **Johnson EM, Ojawang JO, Szekely A, Wallace TL, Warnock DW.** 2005. **Comparizon of in vitro antifungal activities of free and liposome-encapsulated nystatin with those of four amphotericin B formulations.** *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4867-4875.

5- CAPÍTULO 2

(A ser submetido à revista Mycopathologia)

Phenotypic and Genotypic determination of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates

Patricia de Oliveira Kocerginsky^a. Delio José Mora^b. Neiva Tinti de Oliveira^a.
Mariele Carneiro Porto^a. Pedro Henrique dos Santos Soares^c . Rejane Pereira Neves^{a*}.
Nereide Stela Santos Magalhães^c

^a Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Nelson Chaves, s/n, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brasil.

^b Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), Av. Frei Paulino, 30, Abadia, 38025-180, Uberaba, MG, Brasil.

^b Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Manoel de Medeiros, s/n, Dois irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil.

^c Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

*Corresponding author: rejadel@yahoo.com.br, telephone: (+5581) 2126-8570, fax: (+5581) 2126-8482

Abstract

On this work was developed a strategy to compare the classical phenotypical approach with the minisatellite-specific primer M13 in the diagnosis of *Cryptococcus*. From a total of 300 cerebrospinal fluid samples of patients with suspected cryptococcal meningitis, thirty cases (10%) were diagnosed with neurocryptococcosis. All patients except one, who presented Adult T-Cell Leukaemia, were HIV seropositive. The phenotypic identification was realized by colonial aspects, cellular morphologies, microscopic appearance, physiological and biochemical tests. Genotypes were characterized through the use of *URA5* restriction fragment length polymorphisms analysis and the genetic variability was determined using PCR-fingerprinting with the minisatellite specific primer M13. The yeasts presented morphological and physiological characteristics compatible with the genus *Cryptococcus*. All 30 isolates were sensitive to canavanine and showed VNI genotype representing *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A). According to M13 analysis, all isolates showed 100% similarity in their PCR fingerprinting patterns, which may suggest a possible clonal origin. There was no incongruence observed between the classical phenotypical approach results and the molecular identification data. These results reinforce the importance of biochemical tests, as an inexpensive and efficient tool, for a rapid identification and diagnosis of cryptococcosis in the routine analyses in health centers and hospitals. The molecular tests can be employed for identification, typing and molecular epidemiology studies in order to understand geographical expansion and global distribution of *Cryptococcus*.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*; cryptococcal meningitis; clinical isolates; genotype; phenotype.

Introduction

Newly emerging and reemerging infectious diseases have become a major focus of research in the 21st century. Among opportunistic fungal infections, cryptococcosis is the most prevalent systemic mycosis in HIV patients, caused primarily by *Cryptococcus neoformans* species complex, whose members are *C. gattii* and *C. neoformans* [1, 2]. The etiologic agents of cryptococcosis differ in their virulence, geographical distribution, pathogenicity, clinical picture and therapeutic outcome [3-5].

Cryptococcus gattii is distinct from its sibling species *Cryptococcus neoformans* [4]. Classically, *C. gattii* affects healthy hosts living in tropical and subtropical rural areas and it is occasionally isolated from AIDS patients. However, in some African regions it may be the etiologic agent in up to 10% of the cases [6-8]. *C. gattii* can be classified into four discrete molecular types (VGI-VGIV), which represent cryptic species as no nuclear allelic exchange between groups has been observed [9].

Cryptococcus neoformans more commonly infects immunosuppressed hosts and infects almost one million people annually with over 620,000 attributable mortalities [2, 10]. The yeast has been found to be composed of two varieties and three serotypes based on molecular analysis, genome sequence and serological tests, specifically, *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A), *C. neoformans* var. *neoformans* (serotype D) and the hybrid (serotype AD) [11].

The prevailing laboratory investigation model for cryptococcosis includes direct examination, standardized morphological criteria, biochemical and physiological tests, such as L-Canavanine–Glycine–Bromothymol blue media (CGB). This medium was proposed by Kwon-Chung et al. (1982) and *C. neoformans* is distinguished from *C. gattii* by enzymatic differences. Beyond classical identification, molecular techniques have been applied as additional tools for the diagnosis of *C. neoformans* complex [12].

The *Cryptococcus* species complex has been divided into eight major molecular types by PCR-fingerprinting using single primers specific to ISSR (M13) and PCR-RFLP of *URA5* gene from clinical cultures. Results indicate that VNI and VNII genotypes correspond to serotype A, VNIII is related to serotype AD and VNIV to serotype D of *C. neoformans*. However, VGI-VGIV contains isolates of both serotypes (B and C) of *C. gattii* [8, 13, 14]. The molecular tests have high sensitivity and specificity, with the potential to overcome the limitations of conventional diagnosis, in addition, can be employed for identification, typing and molecular epidemiology studies [2, 15].

In the present study, thirty clinical isolates of *Cryptococcus* spp obtained from the cerebrospinal fluid (CSF) of immunocompromised patients, admitted in public hospitals of Recife-PE, have been identified and compared with each other by classical and molecular methods.

Materials and Methods

The protocol was approved by the Ethical Committee for Research in Humans of the Federal University of Pernambuco (*Centro de Ciências da Saúde-UFPE*, permit number 080/09).

Isolation and classical identification

A total of 300 CSF samples were obtained from patients with suspected cryptococcal meningitis over the last four years (2008-2012) at public hospitals of Recife, Pernambuco-Brazil. All the isolates obtained were submitted to phenotypic and molecular identification. The phenotypic identification was realized by colonial aspects on Sabouraud Dextrose Agar-SDA (Difco) plates, cellular morphologies, microscopic appearance using India ink, physiological and biochemical tests [16-18]. The different species were distinguished by canavanine-glycine-bromothymol blue agar medium (CGB) as proposed by Kwon-Chung et al. [18]. The isolates were cultured in plates containing 20 mL of L-canavanine-glycine-bromothymol blue agar medium (CGB) at 37°C. All the plates were observed daily for up to five days.

Molecular Identification

DNA extraction

Yeast were grown on plates containing SDA plus chloramphenicol (50 mg ml⁻¹) at 37°C for 72h and DNA protocol extraction was carried out according to described by Mora et al. (2010). The DNA concentration was determined spectrophotometrically at 260/280 nm. The integrity of the extracted DNA was detected on a 1% agarose gel, visualized under UV light.

Genotype determination by URA5-RFLP

Standard PCR amplification reactions of the URA5 primer were performed with 1.5U of Taq DNA polymerase and 50 ng of each primer URA5 (5'-ATGTCCTCCAAGCCCTCGACTCCG-3') and SJ01 (5'-TTAAGACCTCTGAACACC) (Invitrogen, Brazil). The parameters used were: initial denaturation at 95°C for 4 min followed by 34 cycles amplification: 45s of denaturation at 94°C, 1 min of annealing at 57°C, 1 min of extension at 72°C. A final extension step was applied at 72°C for 10 min. A volume of 30 µL of

the PCR amplicons was double digested with *Sau96I* (10 U/ μ L) and *HhaI* (20 U/ μ L) (New England Biolabs, USA), and then incubated in a dry bath at 37°C for 3h [19]. The molecular types (VNI–VNIV and VGI–VGIV) were assigned by comparison to the reference strains of the eight major molecular types [8, 14]. The PCR fingerprinting profiles were analyzed on the basis of the presence or absence of clear and defined bands in the digitalized gel images.

M13 analysis

The minisatellite-specific core sequence of the wild-type phage M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') was used as single primer in the PCR-fingerprinting [8]. Briefly, the amplification reaction was conducted in a volume of 50 μ L containing 100 ng of DNA, 1 $\times$ PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM KCl), 0.2 mM each of dATP, dCTP, dGTP and dTTP, 2.0 mM of MgCl₂, 0.5 μ M of primer (Invitrogen, Brazil) and 2.5 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Brazil). The PCR consisted of an initial denaturation at 94°C for 10 min, followed by 36 cycles amplification: 1 min of denaturation at 94°C, 1 min of annealing at 50°C, 1 min of extension at 72°C. A final extension step was applied at 72°C for 10 min. Amplification products were separated by electrophoresis in 2% agarose gels in 1 $\times$ Tris-Acetate EDTA (TAE) buffer at 3V/cm of electrodes distance, stained with GelRed® for 30 min and visualized under UV light.

Results

Isolation, morphological and physiological identification

All the isolates showed colonial aspects on Sabouraud Dextrose Agar-SDA (Difco) plates, microscopic appearance in India ink and physiological tests compatible with those described in the literature for yeasts of the genus *Cryptococcus* [16, 17].

Identification of the *Cryptococcus* isolates by canavanine-glycine-bromothymol blue agar medium (CGB)

All 30 isolates were sensitive to canavanine, resulting in no growth or coloration in this selective indicator medium. Base on this result, the *Cryptococcus* isolates were identified as *C. neoformans* [Table 1].

Clinical isolates

From a total of 300 CSF samples of patients with suspected cryptococcal meningitis, thirty cases (10%) were diagnosed with neurocryptococcosis. All patients except one were HIV seropositive. Only one patient presented Adult T-Cell Leukaemia with negative latex agglutination test and with a fatal outcome during treatment. Fifteen (50%) were male, with a mean age of 42.17 (20–65) years.

Molecular Identification

According to URA5-RFLP analysis, all thirty isolates of *Cryptococcus* showed VNI genotype representing *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A) as showed on [Fig. 1](#).

According to M13 PCR-fingerprinting analysis, all *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* isolates, prior characterized by PCR-RFLP of amplification products of the URA5 gene, showed 100% similarity in their PCR fingerprinting patterns, not revealing genetic variability among these isolates as showed on [Fig. 2](#).

Discussion

Encapsulated yeasts as those of the genus *Cryptococcus* are the major cause of invasive fungal diseases. Cryptococcosis emerged as an important opportunistic infection in the early years of the HIV epidemic, affecting approximately 12% of patients with AIDS [20]. The last four decades have witnessed a global steady increase in the incidence and prevalence of cryptococcal diseases [21-23].

In this study we diagnosed thirty cases of neurocryptococcosis. One patient presented Adult T-Cell Leukaemia whereas the remaining 29 were HIV-infected. According to Nguyen et al. [24], Central Nervous System (CNS) cryptococcosis is defined as the isolation of *Cryptococcus* species from the CNS or CSF and patients are classified into three categories: 1) HIV- infected: cryptococcosis occurs in 6% to 13% of patients with AIDS, especially when their CD4⁺ lymphocyte count is below 200/mm³ [21, 25, 26] 2) HIV-uninfected but otherwise immunosuppressed with chronic diseases (lymphoma, leukemia, diabetes, tuberculosis and others); long-term use of antimicrobial drugs and immunosuppressive agents such as corticosteroids [25, 27, 28] 3) HIV- uninfected and nonimmunosuppressed [29-32].

Disease in HIV patients is most usually due to infection with either *C. neoformans* var. *neoformans* or *C. neoformans* var. *grubii* [20]. In this study, we confirmed 30 different clinical isolates of *C. neoformans* using phenotypic tests and identification by molecular methods. According to our results, only the *C. neoformans* specie was founded in both methods analysed. The gold standard for laboratory diagnosis of cryptococcosis has been based on direct microscopy, culture, subsequently biochemical identification and immunodiagnosis, despite some limitations such as the time and labor required for identification [33]. Automated and semi-automated methods can be inconclusive owing to the frequency dependence on supplementary tests for complete microorganism identification [34-38].

Immunodiagnosis tests such as latex agglutination can return false- negative or false-positive results [33]. We had a patient with Adult T Cell Leukemia who exhibited a negative test for latex agglutination. Xiao-guang et al. [22] reported an unusual case of disseminated cryptococcal lymphadenitis in an immunocompetent host who presented fever and lymphadenopathy. Latex agglutination test of serum and cerebrospinal fluid (CSF) were negative, while lymph node biopsy showed *C. neoformans*. According to the authors, the latex agglutination test for detection of cryptococcal is a rapid and reliable method for immunodiagnosis of *C. neoformans* infection, whose sensitivity and specificity were about 98% and 99% respectively. Nevertheless, it still demonstrates certain limitations of false-positivity and false-negativity due to the presence of a malignancy, sarcoidosis, systemic lupus erythematosus or rheumatoid factor, infection with *Trichosporon beigelii*, *Capnocytophaga canimorsus*, acid-fast bacillus or HIV, and contamination with agar syneresis fluid during laboratory pipetting.

Regarding biochemical tests, the canavanine-glycine-bromothymol blue agar medium has been used to differentiate *C. neoformans* and *C. gattii*. It's considered by some authors a useful and rapid method for cryptococcosis diagnosis, although there are few reports of its performance in routine clinical practice [39-41]. Growth on CGB agar indicates that isolates are canavanine resistant, and able to use glycine as a sole carbon source, triggering a bromothymol blue color reaction indicative of *C. gattii*, whereas *C. neoformans* is sensitive to canavanine, and cannot use glycine as a sole carbon source, resulting in no growth or coloration in this selective indicator medium. All the tested isolates have not turned the color to blue, which is indicative of *C. neoformans* strains. Previous reports from southeast Brazil also showed the high prevalence of *C. neoformans* isolates (93.83%) among HIV patients [8]. In contrast, the authors observed five isolates of *C. gattii* which were equally recovered from the patients included in the study.

Regarding molecular methods for detection of *C. neoformans* and *C. gattii*, specific gene sequences from clinical specimens and cultures have been available and gradually have been implemented into clinical practice [1, 42, 43]. In our study, genotypes were characterized through the use of *URA5* restriction fragment length polymorphisms analysis and the genetic variability was determined using PCR-fingerprinting with the minisatellite specific primer M13. PCR fingerprinting and RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) are two of the most useful molecular methods for identification of the *C. neoformans* complex. Many authors have successfully employed *URA5* and M13 as target sequences for typing *C. neoformans* and *C. gattii* [8, 11, 44]. In our study, VNI genotype was found in all

the clinical isolates. Previous reports have demonstrated that the VNI molecular type is the most isolated from both clinical and environmental sources, furthermore is found in various regions worldwide, with emphasis on Latin America [14, 45], including Brazil [19, 46, 47] and Colombia [48]. This genotype also corresponds to the majority isolates of *C. neoformans* from Asian countries as Taiwan [49, 50]. In addition, most of the cryptococcal infections in AIDS patients from other parts of the world are caused by the VNI genotype (serotype A) [8].

Regarding M13 primer results, we have not observed genetic variability among *Cryptococcus neoformans* isolates obtained from immunocompromised patients admitted in public hospital of Recife, Pernambuco, Brasil. Within isolates from HIV patients, we observed 100% similarity of their PCR fingerprinting patterns. The finding of 100% similarity of their PCR fingerprinting patterns may suggest a possible clonal origin. Mora et al. [8] characterized molecularly 77 *Cryptococcus* isolates recovered obtained in cerebrospinal fluid from AIDS patients between 1998 and 2007 in Uberaba Minas Gerais, Brazil. Genotypes were characterized also through the use of *URA5* restriction fragment length polymorphisms analysis, the genetic variability was determined using PCR-fingerprinting with the minisatellite- specific primer M13. The authors also observed two of the three AIDS isolates who relapsed two years or more after the first episode were VNI and 100% identical, suggesting, according to the authors, an endogenous reactivation or a re-infection source. Da Silva et al. [51], as well, observed the same band patterns among *Candida* strains obtained from infants hospitalized in a neonatal intensive care unit from a hospital in Recife-PE, after PCR amplification using M13 primer. Additionally, the authors suggest a possible clonal origin of the four isolates of *Candida pelliculosa*.

On this work was developed a strategy to compare the capability of the classical phenotypical approach (biochemical analysis by CGB agar, molecular methods, such as *URA5* restriction fragment length polymorphisms analysis, and PCR-fingerprinting) with the minisatellite-specific primer M13 in the identification and diagnosis of *Cryptococcus* isolates from clinical cases. All 30 isolates were classified by these two approaches as *C. neoformans*. Likewise, similar results were found by Mora et al. [8] and Byrnes et al. [2].

From the comparative analysis of the *Table 1*, it is possible to observe that there was no incongruence between the classical phenotypical approach results and the molecular identification data. These results reinforce the importance of biochemical tests, as an inexpensive and efficient tool, for a rapid identification and diagnosis of cryptococcosis in the routine analyses in health centers and hospitals.

In conclusion, the use of different techniques for various purposes can either contribute to epidemiological studies [52] or emphasize the relevance to characterization of clinical *Cryptococcus* isolates, in order to understand its geographical expansion and its distribution among HIV patients [8].

Acknowledgements

We thank the Brazilian Council of Research (CNPQ) for granting the fellowship and the Federal University of Pernambuco (UFPE) for providing the infrastructure.

References

1. Bovers M, Diaz MR, Hagen F, Spanjaard L, Duim B, Visser CE, Oogveld HL, Scharringa J, Hoepelman IM, Fell JW, Boekhout T. Identification of genotypically diverse *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates by Luminex xMAP technology. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1874–83.
2. Byrnes JE, Li W, Lewit Y, Ma H, Voelz K, Ren P, Carter DA, Chaturvedi V, Bildfell RJ, May RC, Heitman J. Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States. *PLoS Pathog.* 2010;6:e1000850.
3. Diaz MR, Boekhout T, Theelen B, Fell JW. Molecular sequence analyses of the intergenic spacer (IGS) associated with rDNA of the two varieties of the pathogenic yeast, *Cryptococcus neoformans*. *Syst Appl Microbiol.* 2000;23:535–45.
4. Kwon-Chung KJ, Boekhout T, Fell JW, Diaz M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon.* 2002;51:804–6.
5. Kwon-Chung K, Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res.* 2006;6:574–87.
6. Sorrell TC. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med Mycol.* 2001;39:155–68.
7. Litvintseva AP, Thakur R, Reller LB, Mitchell TG. Prevalence of clinical isolates of *Cryptococcus gattii* serotype C among patients with AIDS in Sub-Saharan Africa. *J Infect Dis.* 2005;192:888–92.
8. Mora DJ, Pedrosa AL, Rodrigues V, Maffei CML, Trilles L, Lazéra MS, Silva-Vergara ML. Genotype and mating type distribution within clinical *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from patients with cryptococcal meningitis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Med Mycol.* 2010;48:561–9.

9. Fraser JA, Giles SS, Wenink EC, Geunes-Boyer SG, Wright JR, Diezmann S, Allen A, Stajich JE, Dietrich FS, Perfect JR, Heitman J. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. *Nat.* 2005;437:1360–4.
10. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 2009;23:525–30.
11. Pedroso RS, Lavrador MAS, Ferreira JC, Candido RC, Maffei CML. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* – Pathogenicity of environmental isolates correlated to virulence factors, susceptibility to fluconazole and molecular profile. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010;105:993–1000.
12. Sidrim JJ, Costa AK, Cordeiro RA, Brilhante RS, Moura FE, Castelo-Branco DS, Neto MP, Rocha MF. Molecular methods for the diagnosis and characterization of *Cryptococcus*: a review. *Can J Microbiol.* 2010;56:445–58.
13. Latouche GN, Huynh M, Sorrell TC, Meyer W. PCR-restriction fragment polymorphism analysis of the phospholipase B (PLB1) gene for subtyping of *Cryptococcus neoformans* isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:2080–5.
14. Meyer W, Castaneda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E, IberoAmerican Cryptococcal Study Group. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:189–95.
15. Leaw SN, Chang HC, Sun HF, Barton R, Bouchara J, Chang TC. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. *J Clin Microbiol.* 2006;44:693–9.
16. Barnett JA, Paine RW, Yarrow D. Yeasts: characteristics and identification. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2000.
17. De Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. 2nd ed. Holland: CBS; 2000.
18. Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gatti* (serotypes B and C). *J Clin Microbiol.* 1982;15:535–7.
19. Igreja RP, Lazera MS, Wanke B, Galhardo MC, Kidd SE, Meyer W. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro. *Med Mycol.* 2004;42:229–38.

20. Chau TTH, Mai NH, Phu NH, Nghia HD, Chuong LV, Sinh DX, Duong VA, Diep PT, Campbell J. A prospective descriptive study of cryptococcal meningitis in HIV uninfected patients in Vietnam. *BMC Infect Dis.* 2010;10:199–207.
21. Putignani L, Antonucci G, Paglia MG, Vincenzi L, Festa A, De Mori P, Loiacono L, Visca P. Cryptococcal lymphadenitis as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome in an HIV-positive patient: a case report and review of the literature. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2008;21:751–6.
22. Xiao-guang XU, Xin-ling BI, Jian-hua WU, Hong XU, Wan-qing LIAO. Disseminated cryptococcal lymphadenitis with negative latex agglutination test. *Chin Med J.* 2012;125:2393–6.
23. Albuquerque PC, Rodrigues ML. Research trends on pathogenic *Cryptococcus* species in the last 20 years: a global analysis with focus on Brazil. *Future Microbiol.* 2012;7:319–29.
24. Nguyen MH, Husain S, Clancy JC, Peacock JE, Hung CC, Kontoyiannis DP, Morris AJ, Heath CH, Wagener M, Yu VL. Outcomes of central nervous system cryptococcosis vary with host immune function: results from a multi-center, prospective study. *J Infect.* 2010;61:419–26.
25. Srinivasan R, Gupta N, Shifa R, Malhotra P, Rajwanshi A, Chakrabarti A. Cryptococcal lymphadenitis diagnosed by fine needle aspiration cytology: a review of 15 cases. *Acta Cytol.* 2010;54:1–4.
26. Kuttiatt V, Sreenivasa P, Garg I, Shet A. Cryptococcal lymphadenitis and immune reconstitution inflammatory syndrome: current considerations. *Scand J Infect Dis.* 2011;43:664–8.
27. González LA, Vásquez G, Restrepo JP, Velásquez M, Ramírez LA. Cryptococcosis in systemic lupus erythematosus: a series of six cases. *Lupus.* 2010;19:639–45.
28. Castro-Ferreira I, Carvalho C, Coentrão L, Gaião S, Bustorff M, Santos J, Sampaio S, Portugal R, Pestana M. Early-onset of disseminated cryptococcal infection in two renal transplant recipients. *Clin Nephrol.* 2011;75:542–6.
29. Qadir I, Ali F, Malik UZ, Umer M. Isolated cryptococcal osteomyelitis in an immunocompetent patient. *J Infect Dev Ctries.* 2011;5:669–73.
30. Qu Y, Liu G, Ghimire P, Liao M, Shi H, Yang G, Xu L, Wang G. Primary pulmonary cryptococcosis: evaluation of CT characteristics in 26 immunocompetent Chinese patients. *Acta Radiol.* 2012;53:668–74.
31. Ye F, Xie JX, Zeng QS, Chen GQ, Zhong SQ, Zhong NS. Retrospective analysis of 76 immunocompetent patients with primary pulmonary cryptococcosis. *Lung.* 2012;190:339–46.

32. Iatta R, Hagen F, Fico C, Lopatriello N, Boekhout T, Montagna MT. *Cryptococcus gattii* infection in an immunocompetent patient from Southern Italy. *Mycopathol.* 2012;174:87–92.
33. Huston SM, Mody, CH. Cryptococcosis: an emerging respiratory mycosis. *Clin Chest Med.* 2009;30:253–64.
34. Gundes SG, Gulenc S, Bingol R. Comparative performance of Fungichrom I, Candifast and API 20C AUX systems in the identification of clinically significant yeasts. *J Med Microbiol.* 2001;50:1105–10.
35. Massonet C, Eldere JV, 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.* 2004;42:2209–11.
36. Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. *Lodderomyces elongisporus* masquerading as *Candida parapsilosis* as a cause of bloodstream infections. *J Clin Microbiol.* 2008;46:374–6.
37. Marklein G, Josten M, Klanke U, Müller E, Horré R, Maier T, Wenzel T, Kostrzewa M, Bierbaum G, Hoerauf A, Sahl HG. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol.* 2009;47:2912–7.
38. Putignani L, Del Chierico F, Onori M, Mancinelli L, Argentieri M, Bernaschi P, Coltella L, Lucignano B, Pansani L, Ranno S, Russo C, Urbani A, Federicibd G, Menichella D. MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping of clinically relevant fungi. *Mol BioSyst.* 2011;7:620–9.
39. Davel G, Abrantes R, Brudny M, Córdoba S, Rodero L, Canteros CE, Perrotta D. 1st environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2003;35:110–2.
40. Klein KR, Hall L, Deml SM, Rysavy JM, Wohlfel SL, Wengenack NL. Identification of *Cryptococcus gattii* by use of L-canavanine glycine bromothymol blue medium and DNA sequencing. *J Clin Microbiol.* 2009;47:3669–72.
41. Faria RO, Nascente PS, Meinerz ARM, Cleff MB, Antunes TA, Silveira ES, Nobre MO, Meireles MCA, Mello JRB. Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in pigeon excrement in the city of Pelotas, State of Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43:198–200.
42. Levy PY, Habib G, Reynaud-Gaubert M, Raoult D, Rolain JM. Pericardial effusion due to *Cryptococcus neoformans* in a patient with cystic fibrosis following lung transplantation. *Int J Infect Dis.* 2008;12:452.

43. Wu Y, Du PC, Li WG, Lu JX. Identification and molecular analysis of pathogenic yeasts in droppings of domestic pigeons in Beijing, China. *Mycopathol.* 2012;174:203–14.
44. Aminnejad M, Diaz M, Arabatzis M, Castañeda E, Lazera M, Velegraki A, Marriott D, Sorrell TC, Meyer W. Identification of novel hybrids between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI and *Cryptococcus gattii* VGII. *Mycopathol.* 2012;173:337–46.
45. Meyer W, Marszewska K, Amirmostofian M, Igreja RP, Hardtke C, Methling K, Viviani MA, Chindamporn A, Sukroongreung S, John MA, Ellis DH, Sorrell TC. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* by a polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA: a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophor.* 1999;20:1790–9.
46. Casali AK, Goulart L, Rosa e Silva LK. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *FEMS Yeast Res.* 2003;3:405–15.
47. Trilles L, Lazéra MS, Wanke BR, Oliveira V, Barbosa GG, Nishikawa MM, Morales BP, Meyer W. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103:455–462.
48. Escandon P, Sanchez A, Martinez M, Meyer W, Castaneda,E. Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. *FEMS Yeast Res.* 2006;6:625–35.
49. Day JN, Hoang TN, Duong AV, Hong CTT, Diep PT, Campbell JI, Sieu TPM, Hien TT, Bui T, Boni MF, Lalloo DG, Carter D, Baker S, Farrar JJ. Most Cases of Cryptococcal meningitis in HIV-uninfected patients in Vietnam are due to a distinct amplified fragment length polymorphism-defined cluster of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VN1. *J Clin Microbiol.* 2011;49:658–64.
50. Liaw SJ, Wu HC, Hsueh PR. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan: serotypes, mating types, molecular types, virulence factors, and antifungal susceptibility. *Clin Microbiol Infect.* 2009;16:696–703.
51. Silva CM, Parahym AMRC, Leão MPC, Oliveira NT, Amorim RJM, Neves, RP. Fungemia by *Candida pelliculosa* (*Pichia anomala*) in a neonatal intensive care unit: a possible clonal origin. *Mycopathol.* 2013;175–9.
52. Garcia-Hermoso D, Janbon G, Dromer F. Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. *J Clin Microbiol.* 1999;37:3204–9.

Table 1. Phenotypic and Molecular determination of the *Cryptococcus* strains

Micoteca URM Number	Substrate	CGB ^a	URA5-RFLP ^b	M13 ^c
5809	LCR	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus</i> spp
5810	LCR	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus</i> spp
5811	LCR	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus</i> spp
5812	LCR	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus</i> spp
5813	LCR	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus</i> spp
5814	LCR	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus</i> spp
5815	LCR	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus</i> spp
5816	LCR	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus</i> spp
5818	LCR	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus</i> spp
5819	LCR	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus</i> spp
5820	LCR	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus</i> spp
5821	LCR	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus</i> spp
5822	LCR	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus</i> spp
5823	LCR	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus</i> spp
5824	LCR	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus</i> spp
5825	LCR	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus</i> spp
6895	LCR	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus</i> spp
6896	LCR	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus</i> spp
6897	LCR	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus</i> spp
6898	LCR	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus</i> spp
6899	LCR	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus</i> spp
6900	LCR	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus</i> spp
6901	LCR	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus</i> spp
6902	LCR	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus</i> spp
6903	LCR	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus</i> spp
6904	LCR	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus</i> spp
6905	LCR	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus</i> spp
6906	LCR	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus</i> spp
6907	LCR	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus</i> spp
6908	LCR	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus</i> spp

LCR= CerebroSpinal Fluid; ^aCGB= Canavanine-glycine-bromothymol blue agar medium (CGB); ^bURA5 restriction fragment length polymorphisms (URA5-RFLP), ^cMinisatellite-specific sequence (M13).

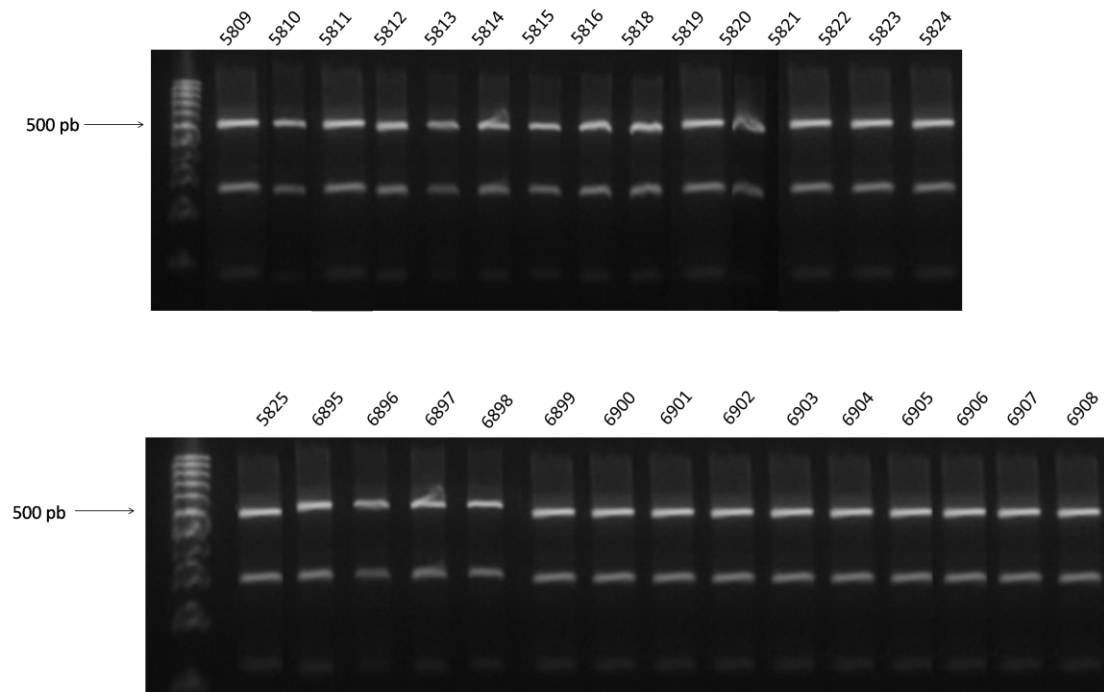


Fig. 1 The *URA5* RFLP profiles after double digestion of amplification products with the enzymes *Sau96I* (10 U/ μ L) and *HhaI* (20 U/ μ L) of thirty *Cryptococcus* isolates obtained from cerebrospinal fluid of patients

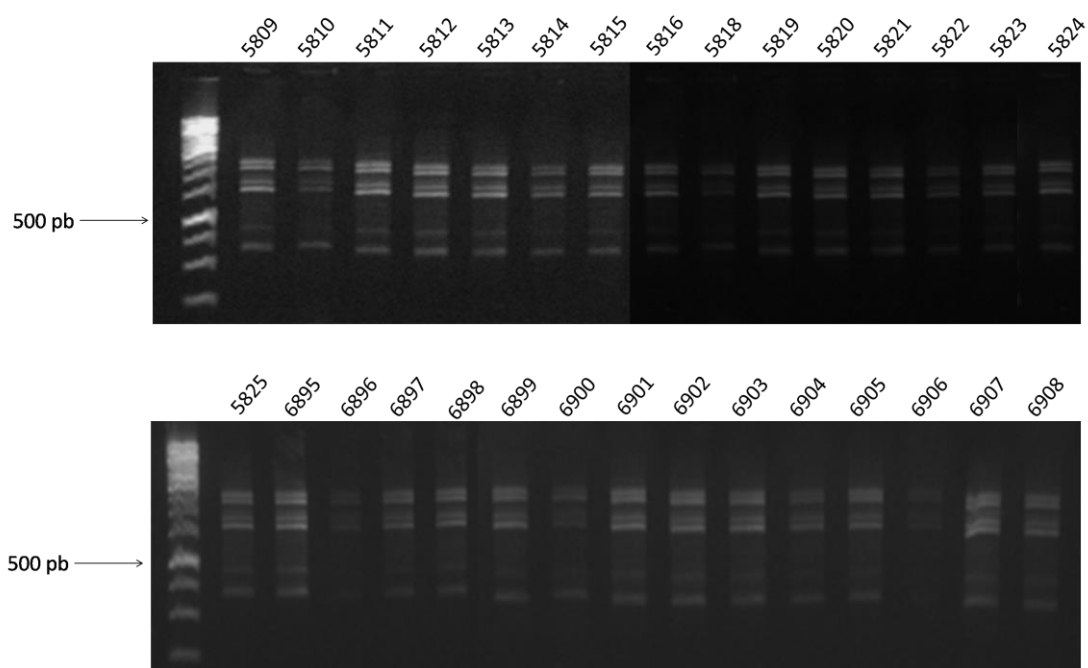


Fig. 2 Bands patterns of microsatellite obtained after PCR amplification of thirty *Cryptococcus* isolates, obtained from cerebrospinal fluid of patients admitted in public hospitals of Recife, Pernambuco, Brazil

6- CAPÍTULO 3

(A ser submetido à revista *Antimicrobial agents and Chemotherapy*)

Antifungal activity of ciclopirox olamine-loaded stealth liposomes in mice infected with the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*

Patrícia O. Kocerginsky^{a,b}, Rejane P. Neves^{a*}, Isabella M. F. Cavalcanti^b, Mariana P. Cabrera^b, Hannah F.S. Lyra^b, Fabíola M.M. Couto^a, Nicodemos T. Pontes-Filho^c, José V.M. Lima-Filho^d, Nereide S. Santos-Magalhaes^b

^a Laboratório de Micologia Médica, Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Cidade Universitária, Av. Moraes Rego s/n, 50670-910, Recife, Brazil.

^bLaboratório de Imunopatologia Keizo-Asami, UFPE, Recife, Brazil.

^aUniversidade Federal de Pernambuco (UFPE), Laboratório de Micologia Médica, Centro de Ciências Biológicas (CCB), Recife, PE, Brazil. ^bUFPE, Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami, Recife, PE, Brazil. ^cDepartamento de patologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE, Brazil. ^dDepartamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, Recife, PE, Brazil.

*Corresponding author: rejadel@yahoo.com.br, Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Nelson Chaves, s/nº- Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brasil.

ABSTRACT

The *in vivo* antifungal activity of the Ciclopirox olamine-loaded stealth liposomes against disseminated infection by *Cryptococcus neoformans* was investigated. Swiss mice were immunosuppressed daily with dexamethasone (0.5 mg/mouse) intraperitoneally for 3 days. This procedure was repeated 4 days later, and the animals were then infected intravenously with *C. neoformans* (10^6 CFU/mL) 1 week later. Seven days after infection, the mice were divided into groups and treated daily with CPO-loaded liposome (Lipo-CPO) (12.5 mg/kg, *iv*) for 7 and 14 days. Amphotericin B (0.5 mg/kg) was used as comparator drug and an additional group received empty liposome. The treatment with Lipo-CPO showed a significant decrease of *C. neoformans* population of 8% in spleen, 41% in liver, 63% in lungs and 90% in brain on day 14 ($P < 0.05$). The treatment with AmB led to a fungal burden reduction of 90.27% in spleen, 31% in liver, 48% in lungs and 58% in brain on day 14. Histological examination showed inflammatory infiltration in the liver of the Lipo-CPO and amphotericin B groups, but less intense than observed in the liver slides of the control group. Histological damage in the brain demonstrated liquefactive and coagulative necrosis after 14 days of infection. The remarkable studies of Lipo-CPO antifungal activity *in vivo* confirms the further application this novel formulation in the systemic cryptococcosis therapy.

Keywords: Liposome-CPO, *Cryptococcus neoformans*, Cryptococcosis, Experimental infection, Amphotericin B

INTRODUCTION

Cryptococcus neoformans is a life-threatening human fungal pathogen that is present in the environment. It is estimated that over 1 million cases of cryptococcosis occurs each year, accounting for more than 600,000 deaths predominantly meningoencephalitis in HIV-infected patients (1-3). *C. neoformans* exists in two varieties, *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A), which causes the majority of infections worldwide, and *C. neoformans* var. *neoformans* (serotype D), which is commonly found in Europe (4).

The first choice in the primary therapy of central nervous system (CNS) infections remains fungicidal drugs, with amphotericin B (AMB) alone or in combination with flucytosine (5, 6). Fungistatic drugs like itraconazole and fluconazole, with less toxicity, are also used in the maintenance of the pulmonary cryptococcosis therapy, but their use in CNS infections has been less than satisfactory. In addition, the extended duration of the therapy with these azoles increases the risk of developing drug resistance (5, 7, 8). Despite antifungal therapies, cryptococcosis still has mortality rates near 20%, which emphasizes the importance to improve and search for alternatives to the current therapy (6).

Currently, liposomes have been developed which are successfully applied against antimicrobial infections (9). Among them, liposomal drug delivery has been used to improve the distribution of antimicrobial agents with low solubility and reduce its toxicity for the treatment of bacterial and fungal infections, as well as cancer (9, 10).

On the basis of the promising in vitro results obtained with the antifungal agent ciclopirox olamine (CPO) against clinical isolates of *C. neoformans* in vitro (Oliveira et al., 2010), we have evaluated in this study the efficacy of CPO-loaded stealth liposomes in a murine model of disseminated infection by *C. neoformans* for further management of disseminated cryptococcosis.

MATERIAL AND METHODS

***C. neoformans* URM5811.** The isolate used in our study was *Cryptococcus neoformans* URM5811 obtained from AIDS patient and stored in the Culture Collection of the URM Micoteca from the Federal University of Pernambuco (11). The strain was chosen among thirty isolates of *C. neoformans* due to its high virulence and sensitivity results in susceptibility tests by standard methodology in prior *in vitro* characterization with ciclopirox olamine (CPO) free and encapsulated into stealth liposomes (Data not shown). The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) for ciclopirox olamine in its free form was 0.30 µg/mL and 1.22 µg/mL, respectively. Ciclopirox olamine-loaded stealth liposomes showed MIC and MFC of 1.22 µg/mL.

Animals and immunosuppression protocol. The experiments were carried out on male Swiss mice, 4-6 weeks old, and each treatment group comprised of six mice. The animals were obtained from the Keizo-Azami Immunopathology Laboratory (LIKA/UFPE) and were kept in animal house with controlled light and dark cycles (12 h), temperature (25°C±3), and humidity (60–70%) and had free access to water and commercial sterile diet (Purina, Paulínia, SP, Brazil). Experimental procedures and animal handling were performed in accordance with the guidelines approved by The Institutional Animal Care and Use Committee of Federal University of Pernambuco (#23076.014650/2012-04).

The immunosuppression protocol was conducted as described by Medeiros et al. 2010. Each mouse received 0.5 mg of dexamethasone (Teuto®, Brazil) intraperitoneally for 3 days and then 4 days thereafter in all experiments. Total leukocyte enumeration in the blood of the immunosuppressed (IS) mice was used to confirm immunosuppression.

Sub-chronic toxicity assays on dexamethasone-treated immunosuppressed mice. Male Swiss mice with approximately 40g in weight were used for sub-chronic toxicity tests, following institutional rules stated by the Animal Ethics Committee of the UFPE. Ciclopirox olamine-loaded stealth liposomes (Lipo-CPO) concentration was 12.5 mg/Kg based on DL50

data obtained previously by Eberhard et al. (12). Then, 0.2 mL of Lipo-CPO was administered daily by the tail vein to IS Swiss mice (N = 5) for 1 week. The control animals (N = 5) received only empty liposomes. The animals were observed during seven days for changes in behavior and physiology patterns. At the end of experiments, the survival animals were sacrificed by anesthesia with Halothane (Halocarbon Laboratories, NJ, USA) and their liver and kidneys were submitted to histological examination.

***C. neoformans* infection model and treatment with Ciclopirox olamine-Loaded liposome (Lipo-CPO).** The experimental model of cryptococcosis was performed accordingly to Medeiros et al. (11) in two steps:

- 1) In order to analyze the protective effect of the Lipo-CPO, seven days after the beginning of immunosuppression, the animals (N = 6) were treated with 0.2 mL Lipo-CPO (0.5 mg/Kg) and Amphotericin B (AmB) (0.5 mg/Kg) by the tail vein. Then, the animals were infected with 0.2 mL *C. neoformans* URM5811 (10^6 cells/mL). Control group mice (N= 6) were treated with empty liposomes under the same experimental conditions.
- 2) To observe the ability of Lipo-CPO to reduce fungal burden, seven days after infection, 0.2 mL CPO-loaded liposome (0.5 mg/kg) was administered daily by the tail vein to IS mice for 7 (N = 6) and 14 (N = 10) days of treatment. The dose of AmB used for the control experiment corresponded to 0.5 mg/kg, and the untreated control group received only empty liposomes. The animals were observed for clinical signs and for mortality every day until the end of the experiments.

***C. neoformans* enumeration and histological examination.** An aliquot of blood for white blood cell count was collected by cardiac puncture after euthanasia with halothane. The organs such as spleen, liver, lungs and brain were removed, weighed and macerated in Phosphate Buffer Saline (PBS) (1:10 or 1:100, w/v). All samples were submitted to serial dilutions and 100 μ L aliquots were stained with China ink to direct examination and the same

amount was added to plates containing Sabouraud Dextrose Agar (Difco) plus chloramphenicol (50 mg/mL), incubated at 37°C for 48-72 h. Concomitantly, tissues were fixed in 10% formaldehyde, processed for paraffin embedding and stained with hematoxylin-eosin for visualization of cytotoxic effects.

Statistical analysis. Data regarding white cell counts and CFU counts were analyzed statistically by the ANOVA and Tukey test, with the level of significance set at $P < 0.05$.

RESULTS

Immunosuppression protocol and *C. neoformans* infection model. As expected, the total and differentiated cell counts showed a decrease after 14 days of infection except for monocyte counts, which remained the same as during the first week ($P < 0.05$) (Fig. 1). In addition, *C. neoformans* URM5811 produced a disseminated infection in IS mice that ranged from 10^4 to 10^6 CFU/g organ 14 days post-infection ($P < 0.05$).

In vivo sub-chronic cytotoxicity of Lipo-CPO. Lipo-CPO at 12.5 mg/kg was not highly toxic to IS mice after daily inoculation for 1 week, since all animals were healthy and survived during the experiment. The formulation used had a particle size of 102 nm and Encapsulation efficiency of $97.36 \pm 0.10\%$. Indeed, histological examination of the liver and kidneys showed no morphological alterations.

Treatment of disseminated cryptococcosis with Lipo-CPO. Lipo-CPO treatment reduced the *C. neoformans* population in the spleen, liver, lungs and brain 7 and 14 days after infection when compared to the empty Liposome group (Fig. 2A and 2B). The treatment with Lipo-CPO showed a significant decrease of *C. neoformans* population of 8% in spleen, 41% in liver, 63% in lungs and 89% in brain on day 14 ($P < 0.05$). The treatment with AmB led to a fungal burden reduction of 90 % in spleen, 31% in liver, 48 % in lungs and 58% in brain on day 14.

Histological examination showed inflammatory infiltration in the liver of the Lipo-CPO and amphotericin B groups, but less intense than observed in the liver slides of the control group. Indeed, liquefactive and coagulative necrosis were visualized in the brain after 7 days of infection. (Figure 3).

DISCUSSION

In the present study, a reliable infection model for experimental cryptococcosis was developed to investigate the ability of the Ciclopirox olamine-loaded liposomes to control the disease. Pharmacokinetics studies of ciclopirox olamine in rabbits revealed the relationship between free and total (free + glucuronide derivatives) ciclopirox is about 50% in the first hour and between 15-20% four hours after intravenous administration. These results suggest that ciclopirox olamine is mainly transformed into glucuronide derivatives, not remarkably toxic to mammalian cells (13). In addition, the authors demonstrated a short half-life for the drug (2.1h), a medium total clearance (0.73 l.h^{-1}) and a good distribution volume (2.2 l). Our data showed Lipo-CPO at 0.5 mg/ kg as nontoxic after 2 weeks of daily exposure, supporting its use in a *C. neoformans* infection model. Moreover, treatment with Lipo-CPO reduced *C. neoformans* population in the lungs (63%) and brain (89%), suggesting that long-term treatment could enhance sterilization in all organs. Regarding the presence of remaining yeasts in all organs analyzed, it may be due to the immunosuppression setting, since the effectiveness antifungal therapy also depends on the immune host mechanisms. (14, 15).

This protective effect was confirmed by histological examination (Figure 3), which revealed a minor organ injury when compared to the empty liposome (EL) group. Conversely, the murine death rate in the Lipo-CPO group may be attributed to some progressively toxic side effect of this drug, since these animals were not especially susceptible to the disease, having leukocyte cell counts similar to those of the EL and amphotericin B groups.

Gupta (2001) reported that CPO mechanisms of action differ from other antimycotic drugs. CPO exerts its activity not directly on the fungal plasma membrane but by the intracellular depletion of some essential substrates and/or ions caused by the inhibition of their uptake. According to Escarrone et al. (16), the complexity of the mechanism of action of ciclopirox olamine should make the development of resistance less likely than with other antifungal drugs.

Although the CPO mechanism of action against cryptococcosis remains unclear, it appears not to be related to activation of the immune system, which could enhance organ clearance. This idea was corroborated by the immune status of Swiss mice during the present experiments, since dexamethasone is known to abrogate B and T cell activation, thereby substantially decreasing humoral and cellular immunity (17). Medeiros et al. (11) also demonstrated an infection model of *C. neoformans* in immunocompromised mice with dexamethasone, in which the leukocytes counts significantly decreased after 14 days of infection, except for the monocytes counts. It was also observed no statistically significant difference in cell count, showing that immunosuppression occurred similarly among the different groups tested.

As expected, all animals treated with empty liposomes had no reduction in CFU of all organs analysed, which confirms the absence of antifungal activity in empty liposomes. Khan et al. (14) observed that empty liposome failed to reduce the fungal burden in lungs and brains of leucopenic mice infected with *C. neoformans*.

Furthermore, the stealth liposomes containing CPO showed efficacy when related to amphotericin B with reduction of *C. neoformans* population of CFU/g organ of 41% in the liver, 63% in the lung and 89% in the brain. Amphotericin B reduced the fungal burden in 31% in liver, 48% in lung and 58% in brain.

On the other hand, AmB reduced the spleen fungal burden in 90%, whereas the lipo-CPO decreased only 8%. This significant discrepancy may be explained since the stealth liposomes formulation present the PEG on its surface which confers a hydrophilic character, therefore the reticuloendothelial system (RES) will not recognize and capture the drug in the spleen. For this reason, the Lipo-CPO will take a longer period of time to act in the spleen (which is the organ central of the RES) and, consequently, is available in the blood circulation to operate in other organs, such as the liver and the brain (18).

All *in vivo* experiments were performed with pegylated liposomes since the conventional liposomes will be quickly cleared from the blood, especially because of the adsorption of plasma proteins (opsonins) onto the phospholipid membrane, triggering recognition and uptake of liposomes by the mononuclear phagocytic system (MPS). Attachment of hydrophilic polymers, usually derivatives of poly ethylene glycol (PEG), could provide steric-stabilization of the vesicles, enabling them to have a prolonged circulating time without being opsonized, recognized and cleared by the MPS, and consequently improve therapeutic efficacy (19, 20). The optimal level of PEGylation on liposomes for long circulation half-life has been extensively studied (19, 21-23).

The particle size is another important parameter when designing liposomes for *in vivo* applications in order to prevent opsonization and RES recognition. We developed and tested a CPO liposomal formulation with final mean size of 102 nm aiming to evaluate its cryptococcal activity particularly in lungs and brain, the two target-organs of *C. neoformans*. This particle diameter is corroborated with studies of Lockman et al. (24), when these authors described that nanocarriers for drug delivery cross the Blood-Brain Barrier (BBB) must have a particle diameter about 100 nanometers. This result also justified the high reduction of *Cryptococcus neoformans* population in brain (89%) observed in our study. The use of liposomes in clinical use for therapeutic diagnostics application represents a substantial

advantage for drug delivery systems across the BBB for effective treatments of many central nervous system disorders.

The present study demonstrated that it is possible to incorporate ciclopirox olamine into stealth liposomes with an encapsulation efficiency above 95%. The developed formulation presented an effectiveness antifungal activity compared to amB which is currently the drug of choice of cryptococcosis. Since AmB is a drug with several side effects such as high nephrotoxicity (3), the search for new therapy strategies for treatment of systemic infections is imperative and Lipo-CPO represents a promising alternative for further clinical application especially in immunocompromised patients.

REFERENCES

1. **Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM.** Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 23:525–530, 2009.
2. **Calvo E, Pastor FJ, Rodríguez M.M, Pujol I, Guarro J.** 2010. Antifungal Therapy in a Murine Model of Disseminated Infection by *Cryptococcus gattii* . *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 4074–4077.
3. **Albuquerque, P.C.; Rodrigues, M.L.** 2012. Research trends on pathogenic *Cryptococcus* species in the last 20 years: a global analysis with focus on Brazil. *Future Microbiol.* 7:319–329.
4. **Desnos-Ollivier M, Patel S, Spaulding AR, Charlier C, Garcia-Hermoso D, Nielsen K, Dromera F.** 2010. Mixed Infections and *In Vivo* Evolution in the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *MBio.* 1: e00091-10.

5. **Saag, M. S., J. R. Graybill, R. A. Larsen, P. G. Pappas, J. R. Perfect, W. G. Powderly, J. D. Sobel, and W. E. Dismukes.** 2000. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. *Clin. Infect. Dis.* **30**:710–718.
6. **Perfect, J. R., W. E. Dismukes, F. Dromer, D. L. Goldman, J. R. Graybill, R. J. Hamill, T. S. Harrison, R. A. Larsen, O. Lorthoraly, M. H. Nguyen, P. G. Pappas, W. G. Powderly, N. Singh, J. D. Sobel, and T. C. Sorrell.** 2010. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of America. *Clin. Infect. Dis.* **50**:291–322.
7. **Friese, G., T. Discher, R. Fußle, A. Schmalreck, and J. Lohmeyer.** 2001. Development of azole resistance during fluconazole maintenance therapy for AIDS-associated cryptococcal disease. *AIDS* **15**:2344–2345.
8. **Soares, B. M., D. A. Santos, L. M. Kohler, G. da Costa Ce'sar, I. R. de Carvalho, M. dos Anjos Martins, and P. S. Cisalpino.** 2008. Cerebral infection caused by *Cryptococcus gattii*: a case report and antifungal susceptibility testing. *Rev. Iberoam. Micol.* **31**:242–245.
9. **Olson JA, Schwartz J, Hahka D, George A, Proffitt RT, Adler- Moore JP.** 2012. Differences in Efficacy and Cytokine Profiles following Echinocandin or Liposomal Amphotericin B Monotherapy or Combination Therapy for Murine Pulmonary or Systemic *Aspergillus flavus* Infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**:218–230.
10. **Cavalcanti IMF, Mendonça EAM, Lira MCB, Honrato SB, Camara CA, Amorim RVS, Filho, J M, Rabello MM, Hernandez MZ, Ayala AP, Santos-Magalhães NS.** 2011. The encapsulation of b-lapachone in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex into liposomes: A physicochemical evaluation and molecular modeling approach. *Eur. J. Pharm. Sci.* doi:[10.1016/j.ejps.2011.08.011](https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.08.011).
11. **Medeiros CSQ, Lima-filho JV, Oliveira PC, Andrade SL, Leal AFG, Camara CA, Neves RP.** 2010. Antifungal activity of beta-lapachone against disseminated infection by *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* strain 5811 on immunosuppressed Swiss mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **43**:345-349.
12. **Eberhard Y, McDermott SP, Wang x, Gronda M, Venugopal A, Wood TE, Datti A, Batey RA, Wrana J, Antholine WE, Dick JE, Schimmer, AD.** 2009. Chelation of intracellular iron with the antifungal agent ciclopirox olamine induces cell death in leukemia and myeloma cells. *Blood* **114**: 3064-3073.

13. **G. Coppi, S. Silingardi.** 1992. HPLC method for pharmacokinetic studies on ciclopirox olamine in rabbits after intravenous and intravaginal administrations. *Farmaco* **47**:779-786.
14. Khan MA, Nasti TH, Owais M. 2005. Incorporation of amphotericin B in tuftsin-bearing liposomes showed enhanced efficacy against systemic cryptococcosis in leucopenic mice. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**:726–731.
15. **Schop J.** 2007. Protective immunity against *Cryptococcus neoformans* infection. *Mcgill J. Med.* **10**: 35-43.
16. **Escarrone ALV, Bittencourt CF, Laporta LV, Santos MR, Primel EG, Caldas SS.** 2008. LC-UV method with Pre-Column derivatization for the determination of Ciclopirox olamine in raw material and topical solution. *Chromatographia* **67**:967-971.
17. **Franchimont D, Galon J, Gadina M, Visconti R, Zhou Y, Aringer M, Frucht DM, Chrousos GP, O'Shea JJ.** 2000. Inhibition of Th1 immune response by glucocorticoids: dexamethasone selectively inhibits IL-12-induced Stat4 phosphorylation in T lymphocytes. *J. Immunol.* **164**: 1768-1774.
19. **Allen TM.** Long-circulating (sterically stabilized) liposomes for targeted drug delivery. 1994. *Trends Pharmacol. Sci.* **15**:215–20.
- 20 **Marjan JM, Allen TM.** 1996. Long circulating liposomes: past, present and future. *Biotechnol. Adv.* **14**:151–75.
21. **D. Papahadjopoulos D, Allen TM, Gabizon A, Mayhew E, Matthay K, Huang SK, Lee KD, Woodle MC, Lasic DD, Redemann C, Martin FJ.** 1991. Sterically stabilized liposomes — improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **88**:11460–11464.
22. **Chow T, Lin Y, Hwang J, Wang H, Tseng Y, Pang VF, Liu R, Lin W, Yang C, Ting G.** 2009. Therapeutic efficacy evaluation of ¹¹¹In-labeled pegylated liposomal vinorelbine in murine colon carcinoma with multimodalities of molecular imaging. *J. Nucl. Med.* **50**:2073–2081.
23. **Lee CM, Choi YD, Huh EJ, Lee KY, Song HC, Sun MJ, Jeong HJ, Cho CS, Bom HS.** 2005. Polyethylene glycol (PEG) modified ^{99m}Tc-HMPAO-liposome for improving blood circulation and biodistribution: the effect of the extent of PEGylation. *Cancer Biother. Radiopharm.* **20**: 620–628.
24. **Lockman PR, Mumper RJ, Khan MA, Allen DD.** 2002. Nanoparticle Technology for Drug Delivery Across the Blood-Brain Barrier. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **28**:1-13.

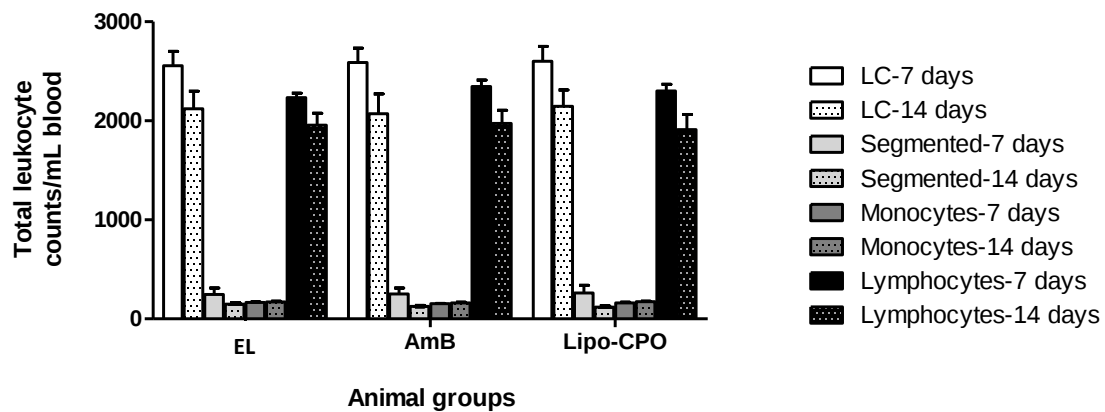


FIG 1. Leukocyte cell counts in dexamethasone-immunosuppressed mice infected with *Cryptococcus neoformans* URM5811 and treated with Ciclopirox olamine-Loaded Liposome. EL= Empty Liposome; AmB= Amphotericin B; Lipo-CPO= Ciclopirox olamine-loaded liposome. * $P < 0.05$, 7 days compared to 14 days of treatment per cell group (ANOVA and Tukey test).

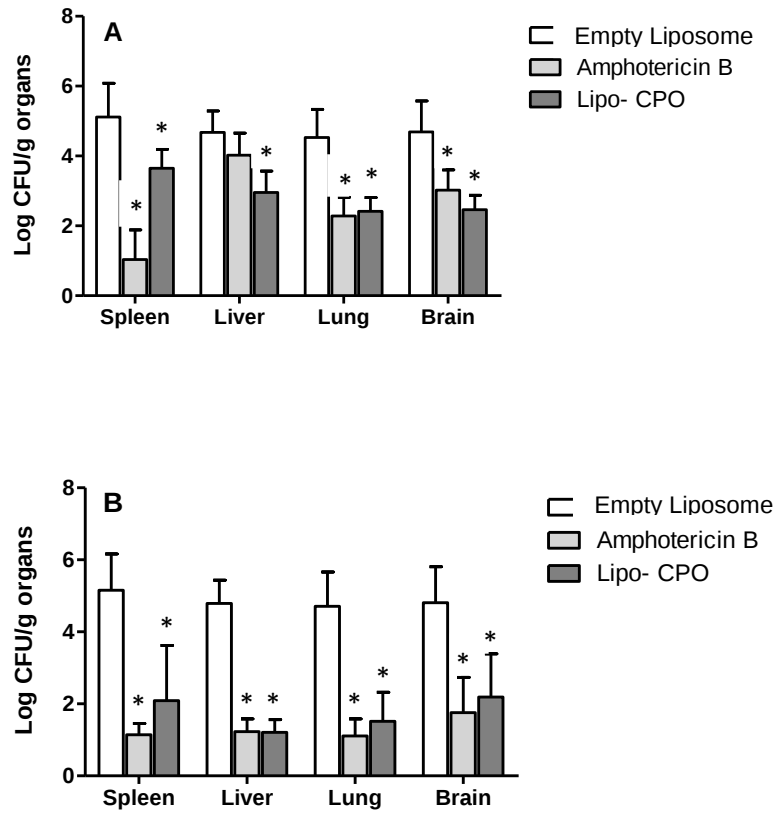


FIG 2 Seven days after infection, mice were treated daily with Lipo-CPO (0.5 mg/kg Lipo-CPO) or amphotericin B (0.5 mg/kg) for 7 (A) or 14 days (B). * $P < 0.05$ compared to the empty liposome group (Tukey test and ANOVA).

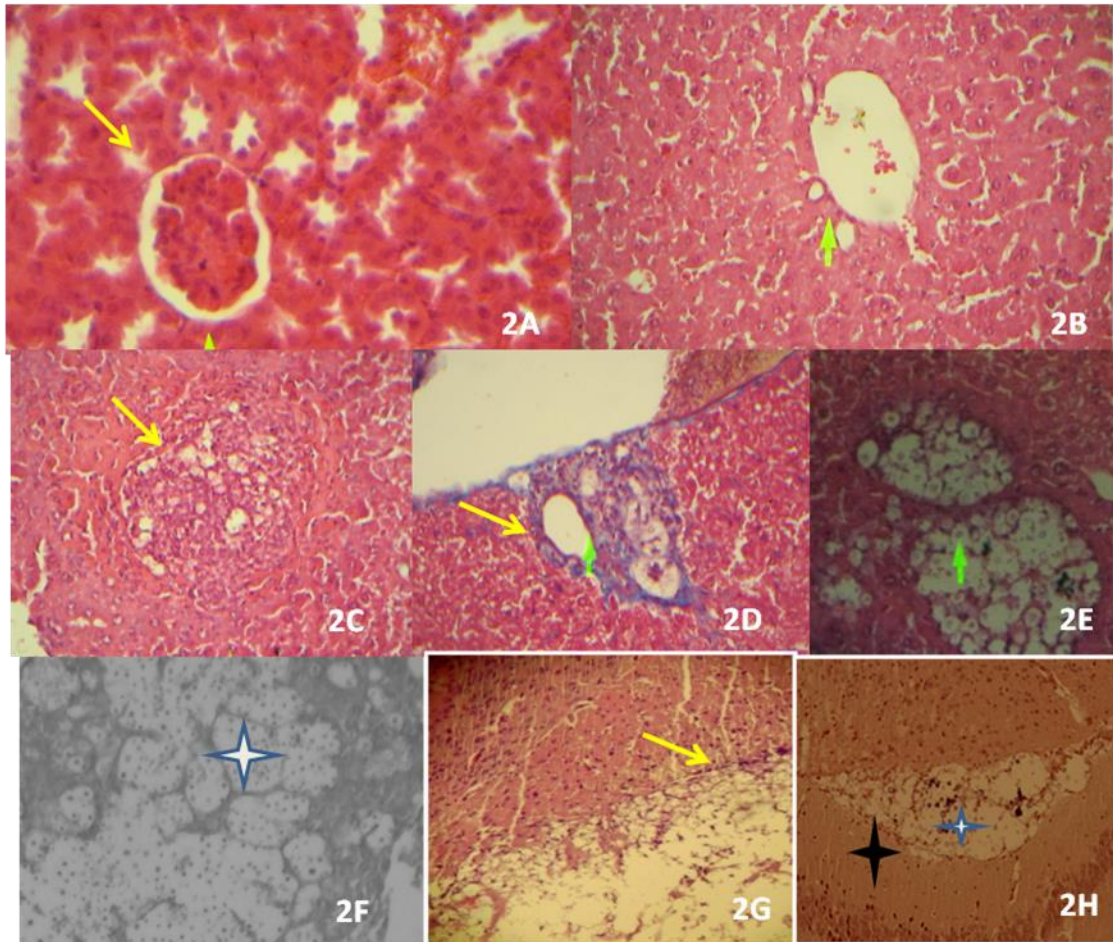


FIG 3 Histopathological examination of cryptococcosis infection model: 2A and 2B show normal glomerulus and tubular cells (kidney) and hepatocytes and vessels (liver) without alterations, respectively, indicating absence of CPO cytotoxicity at 12.5 mg/Kg; 2C-2E demonstrate fungal infiltrate in the liver of empty liposome, Lipo-CPO and AmB groups after 7 days of infection. The histological damage in brain after 7 days is shown in 2F-2H. Liquefactive and coagulative necrosis are indicated by white and black stars respectively. Yellow arrow indicates inflammatory infiltrates near the lesion (400x)

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- O líquido cefalorraquidiano é a amostra ideal para isolamento espécies de *Cryptococcus*.
- Criptococose é a micose mais frequente em pacientes imunocomprometidos.
- Ciclopirox olamina pode ser encapsulada em lipossomas furtivos em concentrações satisfatórias.
- Ciclopirox olamina pode ser encapsulado na fase orgânica de lipossomas nas concentrações de 1, 2 e 2,5 mg/mL.
- Planejamento fatorial a $2^{(4-1)}$ otimiza o tamanho de partícula, PDI, e quantidade de fármaco encapsulado.
- Lipossomas furtivos contendo ciclopirox olamina apresentam *in vitro* uma velocidade de liberação mais controlada do fármaco quando comparado à formulação convencional.
- Amostras de *Cryptococcus neoformans* recém isoladas são sensíveis a ciclopirox olamina livre nas concentrações de 0,3 to 0.61 $\mu\text{g/mL}$ e em lipossomas furtivos e convencionais nas concentrações variando de 1.22 a 2.44 $\mu\text{g/mL}$.
- O primer M13 não revela variabilidade genética entre os isolados, enquanto que o URA5 é capaz de diferenciar *C. neoformans* de *C. gattii*.
- Lipo-CPO com tamanho de partícula de 102 nm apresenta eficácia antifúngica *in vivo* e reduz a população de *Cryptococcus neoformans* no baço, fígado, pulmão e cérebro.
- A utilização de um método padronizado e reprodutível facilita a comparação entre diferentes antifúngicos e entre as diferentes concentrações inibitórias mínimas.
- Encapsulação de Ciclopirox olamina em lipossomas representa uma nova alternativa terapêutica para criptococose sistêmica.
- Esta é a primeira vez em que ciclopirox olamina é encapsulado em lipossomas para viabilizar sua aplicação sistêmica no tratamento de micoses.

ANEXOS

ANEXO A: Instrução aos autores para Submissão na Revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*

Submissão

All submissions to AAC must be made electronically via the eJournalPress (eJP) online submission and peer review system at the following URL: <http://aac.msubmit.net/cgi-bin/main.plex>. (E-mailed submissions will not be accepted.) First-time users must create an Author account, which may be used for submitting to all ASM journals. Instructions for creating an Author account are available at the above URL via the “help for authors” link, and step-by-step instructions for submitting a manuscript via eJP are also available through the same link on the log-in screen or on the account holder’s home page. Information on file types acceptable for electronic submission can be found under the Files heading in the help for authors screen.

ORGANIZATION AND FORMAT

Editorial Style

The editorial style of ASM journals conforms to the ASM Style Manual for Journals (American Society for Microbiology, 2016, in-house document) and How To Write and Publish a Scientific Paper, 7th ed. (Greenwood, Santa Barbara, CA, 2011), as interpreted and modified by the editors and the ASM Journals Department.

The editors and the Journals Department reserve the privilege of editing manuscripts to conform with the stylistic conventions set forth in the aforesaid publications and in these Instructions. Please note that ASM uses the serial comma.

On receipt at ASM, an accepted manuscript undergoes an automated preediting, cleanup, and tagging process specific to the particular article type. To optimize this process, manuscripts must be supplied in the correct format and with the appropriate sections and headings.

Type every portion of the manuscript double-spaced (a minimum of 6 mm between lines), including figure legends, table footnotes, and references, and number all pages in sequence, including the abstract, figure legends, and tables. Place the last two items after the References section. Manuscript pages must have continuous line numbers; manuscripts without line numbers may be editorially rejected by the editor, with a suggestion of resubmission after line numbers are added. The font size should be no smaller than 12 points. It is recommended that the following sets of characters be easily distinguishable in the manuscript: the numeral zero (0) and the letter “oh” (O); the numeral one (1), the letter “el” (l), and the letter “eye” (I); and a multiplication sign (×) and the letter “ex.” (x). Do not create symbols as graphics or use special fonts that are external to your word processing program; use the “insert symbol” function. Set the page size to 8.5 by 11 inches (ca. 21.6 by 28 cm). Italicize any words that should appear in italics, and indicate paragraph lead-ins in boldface type.

Manuscripts may be editorially rejected, without review, on the basis of poor English or lack of conformity to the standards set forth in these Instructions.

Authors who are unsure of proper English usage should have their manuscripts checked by someone proficient in the English language or engage a professional language editing service for help.

Manuscript Submission Checklist

Double-space all text, including references and figure legends.

Number pages.

Number lines continuously.

Present statistical treatment of data where appropriate.

Format references in ASM style.

Provide accession numbers for all newly published sequences in a dedicated paragraph, and if a sequence or sequence alignment important for evaluation of the manuscript is not yet available, provide the information as supplemental material not for publication or make the material available on a website for access by the editor and reviewers.

Confirm that genetic and chemical nomenclature conforms to instructions.

Include as supplemental material not for publication in-press and submitted manuscripts that are important for judgment of the present manuscript.

Full-Length Papers

Full-length papers should include the elements described in this section.

Title, running title, byline, affiliation line, and corresponding author. Each manuscript should present the results of an independent, cohesive study; thus, numbered series titles are not permitted. Exercise care in composing a title. Avoid the main title/subtitle arrangement, complete sentences, and unnecessary articles. On the title page, include the title, the running title (not to exceed 54 characters and spaces), the name of each author, all authors' affiliations at the time the work was performed, the name(s) and e-mail address(es) of the corresponding author(s), and a footnote indicating the present address of any author no longer at the institution where the work was performed. Place a number sign (#) in the byline after the name of the author to whom inquiries regarding the paper should be directed (see "Correspondent footnote" below). Please review this sample title page for guidance.

Study group in byline. A study group, surveillance team, working group, consortium, or the like (e.g., the Active Bacterial Core Surveillance Team) may be listed as a coauthor in the byline if its contributing members satisfy the requirements for authorship and accountability as described in these Instructions. The names (and institutional affiliations if desired) of the contributing members may be given as a separate paragraph in Acknowledgments.

If the contributing members of the group associated with the work do not fulfill the criteria of substantial contribution to and responsibility for the paper, the group may not be listed in the author byline. Instead, it and the names of its contributing members may be listed in the Acknowledgments section.

Correspondent footnote. The e-mail address for the corresponding author should be included on the title page of the manuscript. This information will be published in the article as a footnote to facilitate communication and will be used to notify the corresponding author of the availability of proofs and, later, of the PDF file of the published article. No more than two authors may be designated corresponding authors.

Abstract. Limit the abstract to 250 words or fewer and concisely summarize the basic content of the paper without presenting extensive experimental details. Avoid abbreviations and references, and do not include diagrams. When it is essential to include a reference, use the format shown under “References” below (see the “Citations in abstracts” section). Conclude the abstract with a summary statement. Because the abstract will be published separately by abstracting services, it must be complete and understandable without reference to the text.

Introduction. The introduction should supply sufficient background information to allow the reader to understand and evaluate the results of the present study without referring to previous publications on the topic. The introduction should also provide the hypothesis that was addressed or the rationale for the study. References should be chosen carefully to provide the most salient background rather than an exhaustive review of the topic.

Materials and Methods. The Materials and Methods section should include sufficient technical information to allow the experiments to be repeated. When centrifugation conditions are critical, give enough information to enable another investigator to repeat the procedure: make of centrifuge, model of rotor, temperature, time at maximum speed, and centrifugal force ($\times g$ rather than revolutions per minute). For commonly used materials and methods (e.g., media and protein concentration determinations), a simple reference is sufficient. If several alternative methods are commonly used, it is helpful to identify the method briefly as well as to cite the reference. For example, it is preferable to state “cell were broken by ultrasonic treatment as previously described (9)” rather than “cells were broken as previously described (9).” This allows the reader to assess the method without constant reference to previous publications. Describe new methods completely, and give sources of unusual chemicals, equipment, or microbial strains. When large numbers of microbial strains or mutants are used in a study, include tables identifying the immediate sources (i.e., sources from whom the strains were obtained) and properties of the strains, mutants, bacteriophages, and plasmids, etc.

A method or strain, etc., used in only one of several experiments reported in the paper may be described in the Results section or very briefly (one or two sentences) in a table footnote or figure legend. It is expected that the sources from whom the strains were obtained will be identified.

As noted above, a paragraph dedicated to new accession numbers for nucleotide and amino acid sequences, microarray data, protein structures, high-throughput sequencing data, and MycoBank data should appear at the end of Materials and Methods with a paragraph lead-in specific to the type of data.

Results. In the Results section, include the rationale or design of the experiments as well as the results; reserve extensive interpretation of the results for the Discussion section. Present the results as concisely as possible in one of the following: text, table(s), or figure(s). Avoid extensive use of graphs to present data that might be more concisely or more quantitatively presented in the text or tables. Limit photographs (particularly photomicrographs and electron micrographs) to those that are absolutely necessary to show the experimental findings. Number figures and tables in the order in which they are cited in the text, and be sure that all figures and tables are cited.

Discussion. The Discussion should provide an interpretation of the results in relation to previously published work and to the experimental system at hand and should not contain extensive repetition of the Results section or reiteration of the introduction. In short papers, the Results and Discussion sections may be combined.

Acknowledgments. Please do not include information about direct funding in the Acknowledgments. (See “Funding information” below.) Statements regarding indirect financial support (e.g., commercial affiliations, consultancies, stock or equity interests, and patent-licensing arrangements) may, however, be included. It is the responsibility of authors to provide a general statement disclosing financial or other relationships that are relevant to the study. (See the “Conflict of interest” section above.) Recognition of personal assistance should be given in the Acknowledgments section, as should any statements disclaiming endorsement or approval of the views reflected in the paper or of a product mentioned therein.

Funding information. In the fields associated with the Funding Sources question in the online submission form, authors should list any sources of funding, providing relevant grant numbers where possible, and the authors associated with the specific funding sources. In the event that your submission is accepted, the funding source information provided in the submission form may be published, so please ensure that all information is entered accurately and completely. (It will be assumed that the absence of any information in the Funding Sources fields is a statement by the authors that no support was received.)

Authors may also provide a funding statement. In general, an appropriate funding statement will indicate what role, if any, the funding agency had in your study (for example, “The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.”) Funding agencies may have specific wording requirements, and compliance with such requirements is the responsibility of the author.

In cases in which research is not funded by any specific project grant, funders need not be listed, and the following statement may be used: “This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.”

Appendixes. Appendixes that contain additional material to aid the reader are permitted. Titles, authors, and reference sections that are distinct from those of the primary article are not allowed. If it is not feasible to list the author(s) of the appendix in the byline or the Acknowledgments section of the primary article, rewrite the appendix so that it can be considered for publication as an independent article, either full-length or Short-Form style. Equations, tables, and figures should be labeled with the letter “A” preceding the numeral to distinguish them from those cited in the main body of the text.

References

In the reference list, references are numbered in the order in which they are cited in the article (citation-sequence reference system). In the text, references are cited parenthetically by number in sequential order. Data that are not published or not peer reviewed are simply cited parenthetically in the text (see section ii below).

(i) References listed in the References section. The following types of references must be listed in the References section:

Journal articles (both print and online)

Books (both print and online)

Book chapters (publication title is required)

Patents

Theses and dissertations

Published conference proceedings

Meeting abstracts (from published abstract books or journal supplements)

Letters (to the editor)

Company publications

In-press journal articles, books, and book chapters

Provide the names of all the authors and/or editors for each reference; long bylines should not be abbreviated with “et al.” All listed references must be cited in the text. Abbreviate journal names according to the PubMed Journals Database (National Library of Medicine, National Institutes of Health), the primary source for ASM style (do not use periods with abbreviated words). The EndNote output style for ASM Journals’ current reference style can be found here; click “Open” and then “Download and Install” to save it to your EndNote Styles folder (it should replace any earlier output styles for ASM journals [all ASM journals use the same reference style]).

Follow the styles shown in the examples below for print references.

Caserta E, Haemig HAH, Manias DA, Tomsic J, Grundy FJ, Henkin TM, Dunny GM. 2012. In vivo and in vitro analyses of regulation of the pheromone-responsive prgQ promoter by the PrgX pheromone receptor protein. *J Bacteriol* 194:3386-3394.

Falagas ME, Kasiakou SK. 2006. Use of international units when dosing colistin will help decrease confusion related to various formulations of the drug around the world. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2274-2275. (Letter.) {"Letter" or "Letter to the editor" is allowed but not required at the end of such an entry.}

Cox CS, Brown BR, Smith JC. *J Gen Genet*, in press.* {Article title is optional; journal title is mandatory.}

ANEXO B: Instrução aos autores para Submissão na Revista *Mycopathologia*

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

References

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].

2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].

3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

Journal article

Smith JJ. The world of science. *Am J Sci.* 1999;36:234–5.

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL. Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* 2000; doi:10.1007/s001090000086

Book

Blenkinsopp A, Paxton P. *Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness.* 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

Book chapter

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. In: Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. *International review of cytology.* London: Academic; 1980. pp. 251–306.

Online document

Doe J. Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects.* Royal Society of Chemistry. 1999. <http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document>. Accessed 15 Jan 1999.

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 3 kB)

Tables

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

1) Statement of human rights

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

The following statements should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

For retrospective studies, please add the following sentence:

“For this type of study formal consent is not required.”

2) Statement on the welfare of animals

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists).

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.”

If applicable (where such a committee exists): “All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.”

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer’s web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

- Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

- Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

OPEN CHOICE

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.

The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling ("self-plagiarism")).

A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. "salami-publishing").

No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions

No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ("plagiarism"). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, before the work is submitted.

Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.