

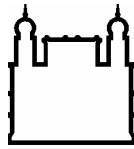
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Ciências com ênfase em Biologia Parasitária

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS INICIAIS PULMONARES NA
INFECÇÃO AGUDA EXPERIMENTAL DE CAMUNDONGOS SWISS
WEBSTER IMUNOCOMPETENTES POR *Cryptococcus neoformans* E
C. gattii

MANOEL GIONOVALDO FREIRE LOURENÇO

Rio de Janeiro
2008



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Doutorado em Ciências com ênfase em Biologia Parasitária

MANOEL GIONOVALDO FREIRE LOURENÇO

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS INICIAIS PULMONARES NA INFECÇÃO
AGUDA EXPERIMENTAL DE CAMUNDONGOS *SWISS WEBSTER*
IMUNOCOMPETENTES POR *Cryptococcus neoformans* E *C. gattii*

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Biologia Parasitária

Orientador (es): Prof. Dr. Marcelo Pelajo-Machado
Profa. Dra. Márcia dos Santos Lazéra

Rio de Janeiro
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Manoel Gionovaldo Freire Lourenço

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS INICIAIS PULMONARES NA INFECÇÃO AGUDA EXPERIMENTAL DE CAMUNDONGOS *SWISS WEBSTER* IMUNOCOMPETENTES POR *Cryptococcus neoformans* E *C. gattii*

INITIAL PULMONARY HISTOPATHOLOGICAL CHANGES IN EXPERIMENTAL ACUTE INFECTION CAUSED BY *Cryptococcus neoformans* E *C. gattii* ON IMMUNOCOMPETENT *SWISS WEBSTER*

Xvi,65f

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Parasitária, 2008.
Orientadores: Marcelo Pelajo-Machado e Márcia dos Santos Lazéra

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, Infecção Pulmonar, Histopatologia Pulmonar, Criptococose Pulmonar.

“ Por que se chamava homem

Também se chamava sonhos

E sonhos não envelhecem ...”

Milton Nascimento-Lô Borges-M.Borges

DEDICATÓRIA

Este trabalho só foi possível graças ao apoio familiar.
À vocês com muito amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores (Dra. Márcia dos Santos Lazéra e Dr. Marcelo Pelajo-Machado) pelos ensinamentos e oportunidades oferecidos durante os anos de convivência. Esse aprendizado não se resume apenas em conhecimentos científicos, mas principalmente humanísticos que me tornaram uma pessoa mais crítica e humana.

Aos amigos do Laboratório de Micologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas-IPEC/FIOCRUZ que muito me ajudaram e a todos amigo (a)s do Laboratório de Histotecnologia do Departamento de Patologia-IOC/FIOCRUZ pelo apoio e compreensão durante todos esses anos de deliciosa convivência.

Aos colaboradores dos trabalhos (Luzia Caputo, Dr. Henrique Leonel Lenzi e Dr. Bodo Wanke) pelo enriquecimento científico, à amiga Marcela Blanças pelos momentos de vivência.

Aos coordenadores do Programa de Qualificação Institucional/PQI-IOC-UEPA, Professores Doutores Cláudio Tadeu Ribeiro e Sílvio Romero Buarque de Gusmão, pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação (PQI/UEPA/UFGA/IEC), por todos os momentos e experiências vivenciadas, que nos fizeram repensar “as velhas atitudes” supostamente “humanas”.

Meu agradecimento especial a todos àqueles com quem desfrutei da convivência na casa amarela (colegas de outros Estados e Países) que, sem a existência da mesma, não teriam a oportunidade de vivenciar a pesquisa no maior templo dedicado a ela, a FIOCRUZ.

À amiga e mãe de todos nós “casa-amarelistas” Dona Vera, obrigado pela sua existência. Também às demais funcionárias da nossa casa amarela/FIOCRUZ.

À Dra. Sonia Rosenthal (IBCCF^o/UFRJ), a primeira pessoa a me desafiar a pensar na realização de um estudo com *Cryptococcus neoformans*. Veja só “os sonhos não envelhecem”.

Aos amigos do Laboratório de Dermato-imunologia (UEPA/UFGA/Marcelo Cândia), Prof. Dr. Cláudio Guedes Salgado, MS. Moisés Batista da Silva e ao meu “irmão de coração” Prof. Dr. Jorge Pereira da Silva.

À Dra. Cíntia Borba, Laboratório de Micologia/IOC, pelo apoio e colaboração na realização de parte dos experimentos.

À Coordenadora do Programa de Biologia Parasitária do IOC/Fiocruz, Dra. Ana Gaspar pelos incentivos.

À minha família, principalmente Juliana, Kadu e Saul, por permitirem que esse sonho se tornasse real.

SUMÁRIO

1.0 – Introdução	1
2.0 – Revisão da Literatura	5
2. 1 – Aspectos históricos - <i>Cryptococcus</i>	5
2. 2 – Taxonomia	7
2. 3 – Ciclo de vida	8
2. 4 – <i>Cryptococcus neoformans</i>	10
2. 5 – <i>Cryptococcus gattii</i>	13
2. 6 – Epidemiologia da criptococose	14
2.6.1 – Epidemiologia da Criptococose por <i>Cryptococcus neoformans</i>	15
2.6.2 – Epidemiologia da Criptococose por <i>Cryptococcus gattii</i>	16
2.6.3 – Epidemiologia dos surtos por <i>Cryptococcus gattii</i>	19
2.6.4 – Epidemiologia molecular	20
2. 7 – A patogenia	21
2. 8 – A patologia	25
2.8.1 – Técnicas para coloração de lâminas no estudo histológico	27
2. 8. 2 – Aspectos clínicos em seres humanos, animais e aves	27
3.0 – Materiais e Métodos	31
3. 1 – Cultura e condições de crescimento	31
3. 2 – Animais utilizados	31
3. 3 – Caracterização dos grupos experimentais	32
3. 4 – Protocolo experimental	32
3. 5 – Desenho do Estudo	34

4.0 – Resultados	35
4. 1 – Achados histopatológicos do pulmão	35
4. 1. 2 – Infecção pulmonar por <i>Cryptococcus gattii</i> (Cg)	35
4. 1. 3 – Infecção pulmonar por <i>Cryptococcus neoformans</i> (Cn)	40
5.0 – Discussão	45
6.0 – Conclusão	49
Perspectiva de publicação	50
Referências Bibliográficas	
Apêndice I	

LISTA DE ABREVIATURAS

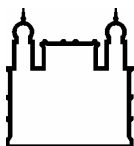
AFLP	(<i>amplified fragment length polymorphism</i>) = polimorfismo da fração longa amplificada de DNA
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CECAL	Centro de Criação de Animais de Laboratório
Classe II B II	Classificação da cabine de segurança
Cg	<i>Cryptococcus gattii</i>
Cn	<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>C. gattii</i>	<i>Cryptococcus gattii</i>
<i>C. hominis</i>	<i>Cryptococcus hominis</i>
<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>Cryptococcus spp</i>	Forma de classificação genérica da espécie <i>Cryptococcus</i>
Ctrl	Controle
<i>E. camaldulensis</i>	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>
ELISA	Ensaio de imunoabsorvência enzimática
et al.	e colaboradores
<i>F. bacillispora</i>	<i>Filobasidiella bacillispora</i>
<i>Filobasidiella spp.</i>	Forma de classificação genérica da espécie <i>Filobasidiella</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
Fig.	Figura
Figs.	Figuras
GalXM	Glactoxilomanana
GXM	Gucuronoxilomanose
H & E	Hematoxilina e eosina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IGS	Intergenic spacers - Espaçadores intergênicos do DNA ribossômico
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
<i>Kryptos</i>	Esconderijo
LCR	Líquor cefalorradiano
LMM 21	Laboratório de Micologia Médica 21
LMM 736	Laboratório de Micologia Médica 736
mating a	acasalamento a
mating α	acasalamento α
MATa	Mating-type a
MAT α	Mating-type α
MEL ⁻	Melanina negativa
MEL ⁺	Melanina positiva
MP	Manoproteína
N	Norte

NE	Nordeste
PAS	PAS = Ácido peróxido de Schiff
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PMN	Polimorfonucleares
p.i	pós-infecção
RAPD/DNA	Amplificação Randômica do Polimorfismo de DNA
S	Sul
SARA	Síndrome da angústia respiratória do adulto
SE	Sudeste
SNC	Sistema Nervoso Central
<i>URA5</i> , <i>CNLAC 1</i> ,	Mapas de links genéticos
<i>CAP59</i> , <i>CAP64</i> ,	Mapas de links genéticos
IGS e ITS rRNA,	Mapas de links genéticos
mtLrRNA)	Mapas de links genéticos
UFC	Unidades formadoras de colônias
var.	Variedade
VG	Variedade <i>gattii</i>
VN	Variedade neoformans
VG1	Variedade <i>gattii</i> I
VGII	Variedade <i>gattii</i> II
VNI	Variedade neoformans I
VG1/AFLP4	genótipo, Variedade <i>gattii</i> I/ polimorfismo da fração longa amplificada de DNA 4, sorotipo B
VGII AFLP6	genótipo, Variedade <i>gattii</i> II/ polimorfismo da fração longa amplificada de DNA 6, sorotipo B
VGIII/AFLP5	genótipo, Variedade <i>gattii</i> III/ polimorfismo da fração longa amplificada de DNA 5, sorotipo B
VGIV/AFLP7	genótipo, Variedade <i>gattii</i> VI/ polimorfismo da fração longa amplificada de DNA 7, sorotipo C.
VNI/AFLP1	genótipo, Variedade neoformans I/ polimorfismo da fração longa amplificada de DNA 1, sorotipo A
VNII/AFLP1A	genótipo, Variedade neoformans I/ polimorfismo da fração longa amplificada de DNA 1A, sorotipo A.
VNIII/AFLP3	genótipo, Variedade neoformans III/ polimorfismo da fração longa amplificada de DNA 3, sorotipo AD
VNIV/AFLP2	genótipo, Variedade neoformans II/ polimorfismo da fração longa amplificada de DNA 2, sorotipo D
Na Cl	Cloreto de Sódio
pH	potencial hidrogeniônico
°C	graus centígrados
g	Grama
mg	Miligrama
µL	micro litro
µm	Micrometro
mL	Mililitro
%	percentual

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Descrição das Figuras	Pág.
Figura 2.1	Ciclo de vida <i>Cryptococcus neoformans</i>	9
Figs. 4.1 – 4.12	Cortes histopatológicos dos pulmões de camundongos Swiss webster instilados intratraquealmente com 10^5 células fungicas de <i>C. gattii</i>	
Figura 4.1	Mostra presença do fungo (sem mudanças morfológicas) em brônquios, bronquíolos e alvéolos ou aderidos à parede do epitélio brônquico (corado por Giemsa), 2h p.i.	35
Figura 4.2	Mostra células de <i>C. gattii</i> interagindo com a parede brônquica, às vezes sendo internalizado através da camada epitelial (corado por Sirius red), 2h p.i.	35
Figura 4.3	Mostra várias células de <i>C. gattii</i> apresentando cápsula começando a brotar (corado por Sirius red), 12h p.i.	35
Figura 4.4	Mostra células encapsuladas do fungo com adesão preferencial por pneumocitos II (corado por Sirius red) 12h p.i.	35
Figura 4.5	Mostra um grande número de células encapsuladas de <i>C.gattii</i> dentro de um infiltrado inflamatório maior no lúmen dos bronquíolos e alvéolos, bem como, infecções focais com atelectasia, (corado por Sirius red), 24 p.i.	36
Figura 4.6	Mostra células fungicas aderidas ao brônquio formando massa compacta por <i>C. gattii</i> e células destacadas do epitélio da mucosa, caracterizando dano do epitélio brônquico (corado por Giemsa), 24h p.i.	36
Figura 4.7	Mostra uma formação de massa, dentro do brônquio, semelhante à observada em 24h p.i. (corado por Sirius red), 48h p.i.	36
Figura 4.8	Mostra células encapsuladas de <i>C. gattii</i> sendo internalizadas através do epitélio brônquico (corado por Sirius red), 48h p.i.	36
Figura 4.9	Mostra obstrução brônquica, causada por formação de massa junto com muco e células fungicas (corado por Sirius red), 72h p.i..	37
Figura 4.10	Mostra células de <i>C. gattii</i> ao redor da artéria brônquica e território linfático (corado por Sirius red), 72h p.i.	37
Figuras 4.11/4.12	Mostram macrófagos hiperplásticos espumosos, alguns contendo partículas fungicas no lúmen dos alvéolos e brônquios (corado por Sirius red) 72h p.i.	37
Figs. 4.13 - 4.24	Cortes histopatológicos dos pulmões de camundongos Swiss webster instilados intratraquealmente com 10^5 células fungicas de <i>C. neoformans</i> .	
Figura 4.13	Mostra o fungo situado no lúmen da árvore respiratória e aderido ao epitélio brônquico, já exibindo uma expansão da cápsula (corado por Giemsa), 2h p.i.	40
Figura 4.14	Mostra variação de tamanho das células de <i>C. neoformans</i> , nos alvéolos e bronquíolos, com o aparecimento de formas brotando, indicativo de multiplicação celular “ <i>in vivo</i> ”, outras células passando através do epitélio brônquico causando dano tecidual local (corado por Grocott) , 2h p.i.	40

Figura 4.15	Mostra formas encapsuladas maiores de <i>C. neoformans</i> , aderidas ao epitélio ou dentro dos espaços alveolares, células fungicas constituindo massa compacta de <i>C. neoformans</i> dentro do lúmen brônquico, bloqueando parcial ou totalmente a via aérea (corado por Giemsa), 12h p.i.	40
Figura 4.16	Mostra células de <i>C. neoformans</i> com brotamentos dentro de uma intensa reação inflamatória, contendo linfócitos, neutrófilos, monócitos e células plasmáticas (corado por Giemsa), 12h p.i.	40
Figura 4.17	Mostra um maior número de células de <i>C. neoformans</i> com brotamentos, acompanhado por intensa reação inflamatória maior que a observada em 12h p.i. Células de <i>C. neoformans</i> dentro de grande infiltrado neutrofílico, caracterizando uma pneumonia supurativa (corado por Giemsa), 24h p.i.	41
Figura 4.18	Mostra células de <i>C. neoformans</i> dentro de intenso infiltrado neutrofílico, com várias células apresentando cápsula e começando a brotar (corado por Giemsa), 24h p.i.	41
Figura 4.19	Mostra uma diminuição no número de células de <i>C. neoformans</i> , bem como, diminuição progressiva na extensão da inflamação. Células de <i>C. neoformans</i> foram observadas dentro do brônquio, artéria brônquica e área peri-brônquica, sugerindo invasão por território linfático (corado por sirius red), 48h p.i.	41
Figura 4.20	Mostra macrófagos com aparência espumosa, contendo elementos fungicos (corado por Sirius red), 48h p.i.	41
Figuras 4.21/4.22	Mostram a mesma obstrução de via aérea por massa fungica compacta e distribuição peri-arterial (peri-linfática) (corado por Sirius red), 72h p.i.	42
Figuras 4.23/4.24	Mostram células de <i>C. neoformans</i> , muito maiores que macrófagos, interagindo com epitélio brônquico sem fagocitose (corado por Sirius red), 72h p.i.	42



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS INICIAIS PULMONARES NA INFECÇÃO AGUDA EXPERIMENTAL DE CAMUNDONGOS SWISS WEBSTER IMUNOCOMPETENTES POR *Cryptococcus neoformans* E *C. gattii*

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Manoel Gionovaldo Freire Lourenço

Introdução: O envolvimento do sistema nervoso central com meningites tem sido tradicionalmente relatado em ambas as infecções por *C. neoformans* e *C. gattii*, com ou sem sinais clínicos ou radiológicos de lesão pulmonar. Quase todas as formas disseminadas por cepas de *C. neoformans* ocorreram em indivíduos imunocomprometidos, exceto em poucos casos com fatores predisponentes, sugerindo a existência de alguns mecanismos de escape. Em contraste, criptococose por *C. gattii*, quase sempre afeta indivíduos sem prejuízo imune identificável, e comumente apresenta lesões de massas pulmonares e sistema nervoso central associado à meningite. Como os mecanismos envolvidos nos estágios precoces da infecção pulmonar por espécies de *Cryptococcus* ainda são poucos conhecidos, foram acompanhados separadamente o processo de internalização, de duas cepas de *C. neoformans* e *C. gattii*, nos pulmões de camundongos imunocompetentes, descrevendo esta penetração e comparando possíveis diferenças. **Materiais e Métodos:** Camundongos Swiss Webster foram instilados intratraquealmente com: a) 10^5 leveduras de *C. neoformans* em 50 μ L de salina (30 animais); b) 10^5 leveduras de *C. gattii* em 50 μ L de salina (30 animais); ou c) 50 μ L de salina sem leveduras de *Cryptococcus* (10 animais). Após a instilação o abdômen dos camundongos foi comprimido e liberado para promover uma inalação profunda. Os animais foram mortos 2, 12, 24, 48 e 72h após a instilação. A cada período os animais foram mortos por injeção intraperitoneal de 1.0 mL de pentobarbital sódico a 2,5%. **Resultados e Discussão:** A histopatologia entre os pulmões de camundongos infectados por *C. neoformans* ou *C. gattii* revelaram peculiaridades importantes. Uma das diferenças principais foi a expressão precoce da cápsula de polissacarídeo por *C. neoformans* em comparação com *C. gattii*. Por causa da expressão precoce da sua cápsula de polissacarídeo, *C. neoformans* é maior em tamanho, o que pode contribuir para seu escape dos mecanismos de defesa do hospedeiro e, maior persistência no trato respiratório. Este mecanismo de escape e a conseqüente dificuldade para difusão resultam numa grande reação inflamatória local acompanhada de brotamento precoce. **Conclusões:** A invasão pulmonar e os mecanismos de disseminação de *Cryptococcus* no trato respiratório em estágios precoces da infecção experimental não dependeram diretamente da participação de células mononucleares e neutrofílicas. Este processo aconteceu, em parte, pela interação física entre os fungos e o epitélio respiratório, contudo sendo desconhecido os mecanismos intrínsecos.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INITIAL PULMONARY HISTOPATHOLOGICAL CHANGES IN EXPERIMENTAL ACUTE INFECTION CAUSED BY *Cryptococcus neoformans* E *C. gattii* ON IMMUNOCOMPETENT SWISS WEBSTER

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Manoel Gionovaldo Freire Lourenço

Summary

Backgrounds/Aims: As the pathogenic mechanisms involved in the early stages of lung infection by *Cryptococcus* species are still poorly known, the process of internalization in the lung in immunocompetent mice we followed separately, describing its penetration and comparing possible differences. The involvement of central nervous system (CNS) with meningitis has been traditionally reported in both *C. neoformans* and *C. gattii* infections, with or without clinical or radiological signs of pulmonary lesion. Almost all disseminated forms by *C. neoformans* strains occur in immunocompromised individuals, except in a few cases without known predisposing factor, suggesting the existence of some escape mechanisms. In contrast, cryptococcosis by *C. gattii* almost always affects individuals with no identifiable immune impairment, and commonly presents, beside meningitis, CNS and pulmonary mass lesions. **Materials and Methods:** Animals were intratracheally instilled with: a) 10^5 yeast cells of *C. neoformans* in 50 μ L of saline (30 animals); b) 10^5 yeast cells of *C. gattii* in 50 μ L of saline (30 animals); or c) 50 μ L of saline without fungi (10 animals). After instillation, mice abdomen was compressed and released to cause deep inhalation. Animals were killed at 2, 12, 24, 48 and 72 hours post-instillation (p.i.). At each period, mice were killed by intraperitoneal injection of 1.0 mL of 2.5% sodium penthotal. **Results/Discussion:** Comparison between *C. neoformans* and *C. gattii* infected mice revealed important peculiarities. One of the major differences was the earlier expression of the polysaccharide capsule by *C. neoformans* in comparison to *C. gattii*. Because of its earlier polysaccharide capsule expression, *C. neoformans* is larger in size, which can contribute for its escape from the host defense mechanisms and longer persistence in the respiratory tract. This escape mechanism and the consequent difficulty to diffusion result in a large local inflammatory reaction and early budding. **Conclusion:** Pulmonary invasion and dissemination mechanism of *Cryptococcus* at the respiratory tract level at the early stages of the experimental infection does not depend directly on the participation of neutrophils and mononuclear cells. That process takes place, in part, through the physical interaction between the fungi and the respiratory epithelium, being the intrinsic mechanisms yet unknown.

1.0 - Introdução

A incidência de doença fungica invasiva aumentou drasticamente durante as últimas décadas correspondendo ao crescente número de pacientes imunocomprometidos. Os principais fatores de riscos para a infecção fungica severa incluem a administração de antibióticos de largo-espectro, o uso de corticosteróide e agentes citotóxicos, procedimentos médicos invasivos, e infecção por HIV. A elevada incidência de infecções fungicas levou os investigadores a identificar determinantes de virulência e a perguntar por que os fungos ambientais podem causar doenças (Casadevall & Perfect, 1998; Kwon-Chung, 1998; Correa et al., 1999; Casadevall & Pirofski, 2000; Grosse, 2001; Pirofski & Casadevall, 2002; Hoang et al., 2004).

A criptococose tem uma distribuição mundial, coloca-se ente as infecções fungicas humanas de significativa letalidade e morbidade, causada por basídiomicetos de fungos zoopatogênicos. No momento, são propostas como seus agentes etiológicos, baseado em conceitos biológicos e fenotípicos, duas espécies distintas de *Cryptococcus*: *C. neoformans* (sorotipos A, D, e AD) e *C. gattii* (sorotipos B e C) (Kwon-Chung et al., 2002; Trilles et al., 2003; Kwon-Chung & Varma, 2006). Tipagens moleculares os separaram em grupos principais (tipo VN para *C. neoformans* e tipo VG para *C. gattii*) correspondendo a genótipos AFLP descritos em grandes séries de isolados clínicos e ambientais, propiciando ferramentas para estudos epidemiológicos globais de criptococose e seus agentes (Kwon-Chung & Bennett, 1984; Franzot, 1999; Steenbergen & Casadevall, 2003).

Micose de natureza sistêmica com porta de entrada inalatória, é causada por leveduras patogênicas conceitualmente pertencentes ao “complexo *Cryptococcus neoformans*” e apresenta-se com diferentes quadros clínico-epidemiológicos: 1) Criptococose por *C. neoformans*, infecção oportunística, cosmopolita, associada à condição de imunodepressão celular, principalmente a aids; 2) Criptococose por *C. gattii*, micose endêmica em áreas tropicais e subtropicais, onde prevalece em indivíduos não imunocomprometidos, apresentando-se similar a outras micoses sistêmicas; 3) Criptococose por *C. gattii* sob a forma de surtos em animais e humanos; 4) Criptococose oportunística por *C. gattii*; e 5) criptococose primária por

C. neoformans em indivíduos aparentemente saudáveis (Kwon-Chung & Bennett, 1992; Passoni et al., 1998; Correa et al., 1999).

A partir da década de 1980, em paralelo à pandemia da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), a criptococose emergiu como importante infecção oportunística associada. Simultaneamente, marcantes mudanças ambientais ocasionadas pelo aquecimento global, desmatamentos desenfreados, queimadas e outras atividades humanas, propiciaram expansão dos agentes desta micose no meio ambiente e, conseqüentemente, maior interação com hospedeiros humanos e animais (Restrepo et al., 2000; Kidd et al., 2004).

O sistema nervoso central (SNC), com lesão meningoencefálica predominantemente de base, representa o principal sítio atingido (90%), estreitamente relacionado ao risco de vida e graves seqüelas, muitas vezes incapacitantes, destacando-se a hipertensão intracraniana, hidrocefalia e perda de visão parcial ou total. Em freqüência de sítios acometidos seguem-se as manifestações pulmonares, cutâneas, ósseas, associadas ou não às do SNC (Kwon-Chung & Bennett, 1992).

Cryptococcus spp. correspondem ao estado assexuado de heterobasidiomiceto, *Filobasidiella* spp., da ordem Tremellales, um grupo de fungos geralmente associados a substratos vegetais, ricos em lignocelulose (Kwon-Chung & Bennett, 1992). Apresenta-se como levedura haplóide, diplóide ou aneuplóide, capsulada, uni ou bibrotante, com a particular propriedade de produzir melanina através difenoloxidase, enzima recentemente identificada como uma lacase (Williamson, 1994).

Estudos feitos por Kwon-Chung & Bennett (1992), apontavam para uma espécie heterogênea com duas variedades distintas (*C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii*). Desses estudos, quatro fenótipos básicos foram identificados pela reatividade de antígenos capsulares a soros hiperimunes, determinados pela estrutura do componente capsular maior, uma glucuronoxilomanose (GXM); denominados sorotipos A, B, C e D. Entretanto, estudos taxonômicos com base no polimorfismo de DNA por AFLP (*amplified*

fragment length polymorphism) e análise de seqüências IGS (intergenic spacers - Espaçadores intergênicos do DNA ribossômico) sugerem tratar-se de duas espécies distintas: *C. neoformans* e *C. gattii*, correspondendo aos teleomorfos *Filobasidiella neoformans* e *F. bacillispora*, respectivamente (Diaz et al., 2000; Boekhout et al., 2001).

Os principais fatores de virulência relacionados à patogenicidade de *Cryptococcus* são: a termotolerância à 37°C, a produção de polissacarídeo capsular e a atividade de lacase. Vários genes relacionados a estes fatores já foram caracterizados e clonados (Wickes, Moore & Kwon-Chung, 1994; Alspaugh, 2000). Outro fator de virulência está relacionado aos tipos sexuais MAT α e MAT a. Modelos animais indicam maior virulência de isolados MAT α , que apresentam também maior resistência aos antifúngicos *in vitro*. Acredita-se que ciclos de reprodução sexuada com *Filobasidiella* spp. possam gerar linhagens recombinantes com novos genótipos e, assim, alterar a virulência de isolados (Kwon-Chung & Bennett, 1978).

O envolvimento do sistema nervos central (SNC) com meningites tem sido relatada tradicionalmente em infecções por *C. neoformans* e *C. gattii*, com ou sem sinais clínicos e radiológicos de lesão pulmonar. Quase todas as formas disseminadas por cepas de *C. neoformans* ocorrem em indivíduos imunocomprometidos (Casadevall & Perfect, 1998), exceto em alguns casos sem fator predisponente conhecido, sugerindo a existência de alguns mecanismos de escape (Kawakami et al., 1997; Kwon-Chung & Bennett, 1984). Em contraste, criptococose por *C. gattii* quase sempre afeta indivíduos sem prejuízo imune identificável, e geralmente apresenta-se associado a meningites, lesões em massa pulmonares e no SNC (Steenbergen & Casadevall, 2003). Foram descritos surtos de pneumonia e infecções do SNC causados por *C. gattii* em animais (Kidd et al., 2004; Franzot et al., 1999; Baró et al., 1998) e também em humanos. Na ilha de Vancouver, Canadá, *C. gattii* Mat α genótipo/molecular VGII/AFLP6 foi identificado como agente de pneumonia e meningoencefalite em humanos, gatos, cachorros e outros animais (Kidd et al., 2004; Baró et al., 1998; Raso et al., 2004).

Vários modelos animais foram usados para o estudo da patogênese da criptococose, inclusive camundongos, porquinhos da índia, ratos e coelhos

(Casadevall & Perfect, 1998). A maioria deles que usou camundongos infectados com cepas de *C. neoformans* pela via intraperitoneal, foi considerada os mais convenientes. Entretanto, a inoculação intratraqueal ou intranasal pode simular uma infecção natural (Casadevall & Perfect, 1998). A patogenicidade de duas cepas de *C. gattii* foi analisada e comparadas para referenciar um modelo de camundongo imunocompetente infectado pela via intraperitoneal (Torres-Rodríguez et al., 2003).

Neste sentido, os objetivos do presente trabalho foram descrever as alterações histopatológicas pulmonares nos estágios iniciais da infecção experimental por *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* via intratraqueal em camundongos *Swiss Webster* imunocompetentes e, os processos de internalização e disseminação desses fungos.

Assim, o estudo produziu dados, que nos levaram a concluir que as alterações histopatológicas pulmonares precoces na infecção pulmonar por *C. neoformans* e por *C. gattii*, apresentando diferenças temporais entre a disseminação das espécies de fungo, a não dependência exclusiva da fagocitose para o processo, e sugere a via linfática peri-brônquica como uma importante alternativa para disseminação.

2.0- Revisão de Literatura

2.1 - ASPECTOS HISTÓRICOS - *CRYPTOCOCCUS*

Cryptococcus spp. foi descrito pela primeira vez por Sanfelice (1894), que realizando estudos a partir do suco de pêssago, isolou uma levedura capsulada, a qual denominou *Saccharomyces neoformans*. Naquele mesmo período, Busse e Buschke (1895) realizaram a descrição do primeiro caso de criptococose humana com isolamento do agente.

Vuillemin (1901) reclassificou os fungos de Sanfelice e Busse para o gênero *Cryptococcus*, denominando-os de *C. neoformans* e *C. hominis*, respectivamente. Vuillemin (1901) também recuperou de uma lesão pulmonar de cavalo, uma levedura semelhante ao fungo observado por Busse e Buschke (1895).

Stoddard e Cutler (1916) descreveram dois casos de meningite e, em estudo histopatológico, visualizaram um halo claro ao redor das leveduras, interpretada como evidência de lise celular, denominando o agente de *Torula hystolytica*.

Benham (1935) fez um estudo detalhado com numerosas leveduras incluindo 22 cepas patogênicas e não patogênicas de *Cryptococcus* isoladas de humanos, concluindo que os isolados formavam uma única espécie, *C. hominis*, com duas variedades. O mesmo autor, por volta de 1950, propôs o nome de *Cryptococcus neoformans* como nome *conservandum*, tanto para isolados ambientais quanto para os achados clínicos, encerrando a polêmica em torno de designações inadequadas até então usadas para casos de criptococose, tais como: Doença de Busse-Buschke, blastomicose, turulose e saccharomicose.

Beker et al. (1950), realizaram necropsias e documentaram a existência de uma infecção primária complexa em indivíduos com e sem história de criptococose. Aqueles estudos estabeleceram que a patogênese da criptococose fosse semelhante à de *Mycobacterium tuberculosis* e envolvia uma infecção pulmonar inicial que produzia uma inflamação granulomatosa dentro do pulmão.

Emmons (1955) obteve o primeiro isolamento ambiental do fungo de ninho e fezes de pombos e de solos contaminados por estes. A partir de então, numerosos trabalhos evidenciaram a presença do fungo no meio ambiente, em diversas partes do mundo, sempre relacionada a excretas de pombos, principalmente em centros urbanos.

Staib (1963) demonstrou que *C. neoformans* produzia colônias marrons quando cultivado em determinados meios, indicativo de sua capacidade de sintetizar melanina.

Estudos imunológicos das amostras isoladas de pacientes com criptococose, realizados por Benham (1935) e por Evans (1950), evidenciaram diferenças antigênicas, determinadas pela composição do polissacarídeo capsular do fungo, identificando três sorotipos – A, B e C. Vogel, vinte anos depois, identificou um quarto sorotipo, o D, que também foi descrito por Walter & Coffee (1968).

Gattii & Eckels (1970) observaram uma levedura capsulada, de morfologia alongada em forma de charuto, ao lado de células arredondadas clássicas. A levedura foi isolada do líquido de um menino da África Central, antigo Congo Belga, que apresentava manifestações meníngeas. No mesmo ano, Vanbreuseghem & Takashio (1970), estudando o agente isolado por Gatti, descreveram uma nova variedade para a espécie, denominando-a *C. neoformans* variedade *gattii*.

O ciclo de vida de *C. neoformans* ainda não era conhecido quando Kwon-Chung (1975), estudando 15 amostras do fungo, observou em laboratório a reprodução sexuada, através de cruzamentos entre dois tipos sexuados, chamando-os de “ α ” e “a”. Demonstrou que o cruzamento de um com o outro produz um terceiro, de fase sexuada ou teleomórfica, filamentosos, denominando-o *Filobasidiella neoformans*.

Kwon-Chung et al. (1982), re-estudando a taxonomia das espécies de *Filobasidiella* e seus anamorfos, concluíram que o cruzamento entre as variedades *gattii* e *neoformans* produzia uma progênie viável, com evidências de recombinação e rearranjo do DNA fúngico, definindo uma só espécie sexuada: *Filobasidiella neoformans*, com duas variedades, *neoformans* e *bacillispora*. O correspondente

assexuado seria *C. neoformans* var. *neoformans*, sorotipos A e D, e *C. neoformans* var. *gattii*, sorotipos B e C (Kwon-Chung 1975, 1976; Kwon-Chung et al.,1982).

2.2 - TAXONOMIA

A palavra *cryptococcus* deriva do prefixo “cript” ou “cripto”, que procedem do grego **Kryptos = esconderijo**, que significa ocultos. A terminologia foi criada em 1833 por Kützing (Oliveira, 2001).

Cryptococcus neoformans pertence ao reino Fungi, filo basidiomycota, ordem Filobasidiales, família Filobasidiaceae e gênero Filobasidiella (Kwon-Chung et al.,1982).

A taxonomia dos agentes da criptococose vem sofrendo mudanças contínuas desde seu primeiro isolamento, em 1895 (Drouhet, 1997). Até 1950, foram muitas as nomenclaturas usadas, o que gerou bastante confusão, quando então se estabeleceu uma só espécie como agente etiológico para esta micose, *Cryptococcus neoformans* (Benham, 1950), com quatro fenótipos básicos identificados pela reatividade de antígenos capsulares a soros hiperimunes, denominados sorotipos A, B, C e D (Kwon-Chung & Bennett, 1992).

Posteriormente, foi descrita uma variedade distinta, *C. neoformans* var. *gattii* (De Vroey & Gattii, 1989), a partir de isolado obtido de caso em menino na África Central. Kwon-Chung et al. (1982), após descobrirem a forma sexuada, *Filobasidiella neoformans*, reconheceram duas variedades, tanto na fase assexuada quanto na fase sexuada: *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipos A e D, correspondente a *F. neoformans* var. *neoformans*) e *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C, correspondente a *F. neoformans* var. *bacillispora*).

Em recente revisão filogenética, diferentes genes (*URA5*, *CNLAC1*, *CAP59*, *CAP64*, IGS e ITS rRNA, mtLrRNA) de ambas as variedades foram analisados. Independente do marcador utilizado, a variedade *gattii* constitui grupo monofilético distinto e divergente da variedade *neoformans*. Estudos de polimorfismo de DNA por AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) diferenciam a variedade *gattii*,

atualmente reconhecida como espécie distinta (Boekhout et al., 2001; Kwon-Chung et al., 2002; Gams, 2005).

Assim, atualmente são reconhecidas duas espécies dentro do “complexo *C. neoformans*”: *Cryptococcus gattii* (antes *C. neoformans* var. *gattii*) e *Cryptococcus neoformans* (antes *C. neoformans* var. *neoformans*).

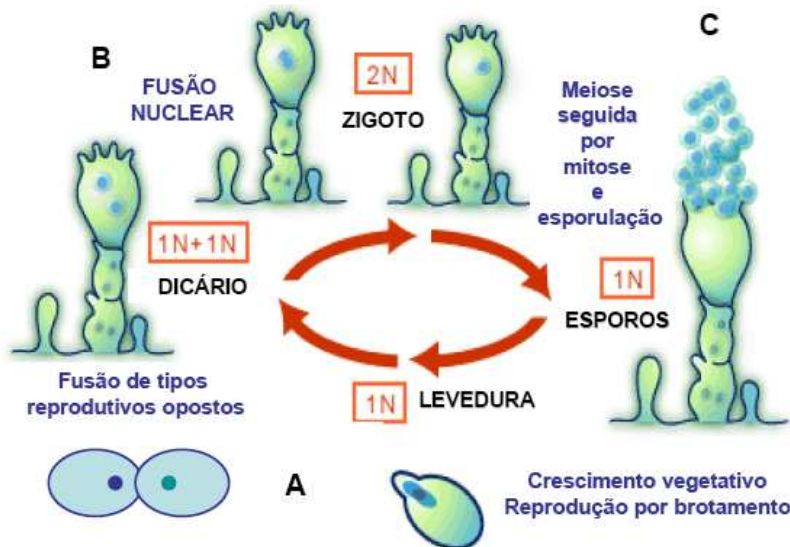
2.3 - CICLO DE VIDA

Segundo Oliveira (2001), estudos realizados por Shadomy & Utz (1966) estimularam Kwon-Chung (1975) a investigar e avançar nas descobertas do ciclo de vida desse fungo. A reprodução desse microorganismo em estado anamorfo ou assexuado ocorre por brotamento único ou duplo, surgindo de local não específico na parede celular. Os blastoconídios formados permanecem, ou não, ligados à parede celular que os originou, por um istmo estreito. Em cultivo, apresenta-se como levedura haplóide, de aparência globosa, ovalada ou apiculada (Willianson et al., 1996). Cultivado em meios sólidos, como Agar Sabouraud glicose, após três dias de incubação à temperatura de 25° a 37° C, observa-se colônia branca, brilhante, de textura mucóide, com bordas lisas e regulares e ausência de pseudo-hifas ou micélio (Kwnon-Chung & Fell,1987).

Desconhecida em condições naturais, a reprodução na forma sexuada ou teleomórfica ocorre após conjugação de duas células haplóides de sexualidade distinta, “Mating-types” α e a , em estado de carência nutricional, além de meio apropriado como Agar extrato de malte e temperatura de 25 a 37°C, ocorrendo, assim, a fase dicariótica do ciclo de vida do microorganismo. Após uma semana, macroscopicamente, verifica-se o desenvolvimento do micélio com hifas hialinas e suas derivações. Na porção terminal ou ramos laterais da hifa, desenvolvem-se os basídios, de estrutura longa e delgada, asseptados e com porção apical dilatada. O núcleo formado após a meiose dá origem a quatro núcleos haplóides, que sofrem repetidas mitoses e formam os basidiósporos dotados de estrutura oval, elíptica ou globosa, parede pouco rugosa ou lisa, com célula única, desenvolvendo quatro

cadeias de até 20 basidiósporos, encerrando, dessa forma, o ciclo reprodutivo (Nishikawa, 2000; Trilles, 2000; Fortes, 2001).

Fig. 2.1 – Esquema representativo do Ciclo de Vida de *C. Neoformans* e *C. Gattii*. A) Fusão de duas Células Mat Complementares e formação da Hifa Dicariótica. B) Cariogamia. C) Meiose Esporulação.



FONTE: SIMMER, M.; SECKO, D.M. A peach of a pathogen. Disponível em: <<http://bioteach.ubc.ca/Biodiversity/APeachOfAPathogen/index.htm>> Acesso em: 21 ago. 2008. Modificada por Manoel Gionovaldo Freire Lourenço

A limitação de nutrientes e a presença de feromônios são fatores primordiais para a ocorrência de cruzamento. Quando dois isolados MAT complementares são misturados e incubados, as células leveduriformes conjugam-se e produzem hifas dicarióticas com grampos de conexão. As hifas produzem basídios terminais subglobosos ou clavados, onde ocorre a cariogamia, meiose, mitose e, então os basidiósporos germinam à levedura (Kwon-Chung & Bennett, 1992; Sorel & Ellis, 1997; Lengeler et al., 2001).

Kwon-Chung et al. (1992), realizaram cruzamento contínuo *in vitro* com cepas de *C. neoformans* Mat a e Mat α e, demonstraram que a taxa 1:1 esperada entre Mat a e Mat α não ocorria. Entretanto, a cada cruzamento, o cariótipo tornava-se mais similar ao parental Mat α , além da diminuição progressiva na capacidade de cruzamento. Assim, na oitava geração foram observados basídios sem esporos, caracterizando a forma pouco fértil. Apesar dos estudos sugerirem essa condição, pesquisas identificaram, na Austrália, cepas ambientais de *C. gattii* Mat a e Mat α na mesma proporção, indicando a recombinação sexual (Trilles, 2000).

Análises realizadas por meio da PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos para genes α e a , mostraram que o sorotipo AD é heterozigoto para o *locus* reprodutivo, podendo ser encontrado como aneuplóide ou diplóide, sendo resultado da reprodução dos sorotipos A MAT α e D MAT a (Chaturvedi *et al.*, 2000; Boekhout *et al.*, 2001; Lengeler *et al.*, 2001).

A determinação do fenótipo e da ploidia é importante para o entendimento da ecologia e virulência do fungo, sendo que MAT α é considerado mais virulento (Kwon-Chung e Bennett, 1992; Mitchell e Perfect, 1995; Ohkusu *et al.*, 2002). Chaturvedi *et al.* (2000) desenvolveram um teste simples para distinguir isolados de *Cryptococcus* spp. quanto ao tipo reprodutivo, baseado nos feromônios MAT α e MAT a amplificados pela PCR.

2.4 - *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

É a forma assexuada do basideomiceto *Filobasidiella neoformans*, que se apresenta como levedura capsulada, zoopatogênica, cosmopolita e oportunista, com células tipicamente arredondadas, algumas são ovóides, ocasionalmente alongadas, uni ou bi-brotantes, envoltas em característica cápsula mucopolissacáride (Benham, 1956; Kwon-Chung, 1992).

A cápsula foi o primeiro fator de virulência a ser definitivamente associado com a habilidade para produzir doença (Evans, 1950; Ikeda *et al.*, 1985; Wilson, Bennett e Bailey, 1986; Kwon-Chung, 1975 e 1976). É constituída por três estruturas antigênicas, atualmente bem caracterizadas. O componente principal da cápsula, correspondente a 88%, é a glicuronoxylomanana (GXM), formada por um polímero de manose, xilose, galactose, ácido glucurônico e grupamentos laterais O-acetil. A estrutura da GXM é determinante dos sorotipos A, B, C, D e do híbrido AD, que apresentam epidemiologia e ecologia diferentes. Os demais percentuais 12%, são compostos por galactoxylomanana (GalXM) formada por manose, xilose e galactose, e a Manoproteína (MP) (Kwon-Chung, 1975 e 1976; Cherniak & Sundstrom, 1994; Turner *et al.*, 1992).

Cryptococcus neoformans possui uma complexa composição bioquímica, formada por uma parede rígida, composta principalmente por glucanas (James et al., 1990).

A cápsula que envolve a célula do agente é usualmente espessa, viscosa, cujo diâmetro pode variar de 2,5 a 14 μm . Algumas cepas podem mostrar cápsulas menores, de 2 a 5 μm , e outras podem ser maiores, podendo alcançar 80 μm . Há evidências de que os diferentes tamanhos da cápsula se originam principalmente de fatores genéticos e da influência exercida sobre o fungo pelo meio em que se encontram. Assim, uma mesma cepa pode, em condições patogênicas “*in vivo*”, apresentar tamanhos maiores do que em meio de cultivo “*in vitro*” (Cruickshank et al., 1973).

Postula-se que a cápsula funciona como agente regulador que possibilita a adaptação do *C. neoformans* frente às mudanças no meio. Quando estão disponíveis nutrientes e água, a síntese capsular é contida. Porém, sob condições de diminuição da concentração de nitrogênio ou de difusão de líquidos, a síntese da cápsula é estimulada. Além disso, em condições áridas (secas), a cápsula, que é hidrofílica, colapsa para proteger a levedura da desidratação (Cherniak & Sundstrom, 1994).

Outros autores relatam que a maior função que a cápsula exerceria, seria na promoção da evasão do *C. neoformans* frente às defesas do hospedeiro, pelo fato de que os fagócitos não reconheceriam a superfície capsular. Em células pouco capsuladas, a fagocitose ocorre com mais facilidade (Hogan et al., 1996). Os isolados acapsulares são englobados por fagócitos, possivelmente pelo reconhecimento de receptores de manose e α -glucagon, presentes na célula (Cross & Bancroft, 1995). Cepas acapsuladas encontradas naturalmente ou em processo de mutagênese, apresentam virulência bastante diminuída (Kozel & Cazin, 1971; Fromtling et al., 1982; Jacobson et al., 1982; Chang & Kwon-Chung, 1994).

Cepas capsuladas obtidas de casos clínicos de criptococose, submetidas “*in vitro*” à radiação ultravioleta, tornam-se mutantes, com “cápsulas diferentes ou acapsuladas”, com pouca ou nenhuma virulência. Posteriormente, ao ser retirado o

“fator stress” as cepas recuperam a capacidade de produzir cápsula e tornaram-se novamente virulentas (Bulmer et al., 1967).

Em cultivo, *C. neoformans* pode crescer tanto em Sabouraud-glicose 2% à temperatura ambiente como em ágar de cérebro-coração a 37°C. Em meio de cultivo líquido, tem crescimento em forma de botão, com formação de anel, ocasionalmente formando uma película. Nos cultivos sólidos, como agar sabourad glicose, agar extrato de malte e levedura, apresentam crescimento variado, geralmente de cor branca para creme, que pode tornar-se creme mais escuro, porém sem produzir pigmentos carotenóides visíveis. Comumente, são colônias brilhantes, com aparência mucóide (Benham, 1956).

Cryptococcus neoformans possui duas formas sexuadas. Essas duas formas, “mating a” e “mating α ” podem fundir-se em condições apropriadas para transformar-se em basideomiceto do gênero *Filobasidiella*, pertencente à ordem *Tremellales* e família *Tremellaceae* (Fell et al., 1998). Um levantamento para a freqüência de ocorrência de cada uma destas formas sexuadas em isolados clínicos e do meio ambiente, mostrou que o tipo α é mais freqüente que o tipo a. Essa freqüência sugere que o tipo α tem uma maior virulência e capacidade para sobreviver no meio ambiente (Kwon-Chung et al., 1982). Estudos têm relacionado a virulência do fungo às suas duas formas sexuadas “mating a” e “mating α ”. Para que ocorra o ciclo sexuado, torna-se necessária a presença de tipos sexuados opostos num estado de carência nutricional. Leveduras de *C. neoformans*, “Mat α ” e “Mat a”, quando cruzadas em meio apropriado, fundem-se para formar o elemento dicariótico, seguindo-se alongamento com formação de hifa, fusão nuclear com formação de núcleo diplóide na porção apical dilatada da hifa onde, após algum tempo surgem basidiósporos haplóides (Moore & Edman, 1993).

A região do DNA responsável pela produção do feromônio (lócus Mat α) é encontrada apenas nas células “Mat α ” e está presente em cópia única no ácido dextrorribonucleíco (DNA) nuclear da célula. A ausência de cópias silenciosas de alelos “Mat α ”, explica porque não há troca de tipos sexuais, como visto em *Saccharomyces cerevisiae*. Achados sinalizam que o tipo “mating α ” é de alta

virulência quando comparado ao tipo “mating a” (Kwon-Chung, 1992; Moore & Edman, 1993).

Após os achados de Emmons (1955), estudos com grandes amostragens em diferentes regiões do mundo mostraram que *C. neoformans* está amplamente difundido no meio ambiente e relacionado a habitats de aves. Esta variedade é encontrada em vários substratos orgânicos, principalmente aqueles com alto conteúdo de nitrogênio, como uréia, creatinina e xantina, substâncias encontradas na urina eliminada por aves.

C. neoformans tem sido estudado principalmente em ambientes urbanos, onde é clássica sua relação com habitat de pombos, além de outras aves, como psitacídeos. Na área urbana do Rio de Janeiro, o fungo foi isolado de fezes de pombos, solo, prédios abandonados, prédios públicos, igrejas, praças, calçados, em vários tipos de detritos contaminados por fezes de aves e, ainda, de poeira domiciliar (Lazera et al., 1989; Passoni et al., 1998).

2.5 - *CRYPTOCOCCUS GATTII*

Até 1990, o habitat natural de *Cryptococcus gattii* era desconhecido quando, na Austrália, foi encontrado associado a *Eucalyptus camaldulensis* (Ellis, 1990). Mais tarde, foi isolado de outras espécies de eucaliptos, seguindo-se isolamentos de fontes ambientais na Califórnia (Pfeiffer, 1991), Brasil (Wanke et al., 1995), México (Licea et al., 1996) e Itália (Montagna et al., 1996).

Assim, o único habitat natural e fonte de infecção conhecidos até 1995, estavam relacionados a espécies de eucaliptos, árvores originárias da Austrália, o que levou Ellis (1990) e Pfeiffer (1991) a sugerirem que fossem árvores hospedeiras do *C. gattii* e que a sua exportação para diversas regiões de todos os outros continentes contribuiu para sua dispersão, uma vez que coincidia com a distribuição de casos humanos.

No entanto, estudos ambientais mais recentes no Brasil demonstraram *C. gattii* e *C. neoformans* colonizando ocos de árvores vivas, apontando para um

possível nicho ecológico primário para ambas as espécies, relacionado à decomposição de madeira, mais especificamente ao processo lignolítico (Wanke et al., 1996). Estes achados trouxeram uma nova visão sobre a ecologia deste agente, e também sobre fontes ambientais potencialmente relacionadas às árvores tropicais nativas ou adaptadas. Mais recentemente, Lazera et al. (1993, 1996, 1998 e 2000) isolaram *C. neoformans* do oco de árvores em ambientes urbanos, no Rio de Janeiro e nas regiões Norte (Roraima) e Nordeste (Piauí) do Brasil.

Cryptococcus neoformans é encontrado com maior frequência em ambientes urbanos e *C. gattii* tem uma distribuição geográfica mais restrita a regiões tropicais e subtropicais, predominantemente em populações que vivem nas áreas rurais (Lazera et al., 1993; Nishikawa et al., 2003).

O fungo atinge elevadas concentrações em substratos secos, caracterizando micro-focos ambientais, a partir dos quais os propágulos se dispersam no ar e podem ser inalados, causando infecção ou doença (Kwon-Chung, 1992). Estudos realizados na África e no Brasil evidenciaram elevados índices de contaminação da poeira domiciliar e de amostras do peridomicílio (13 a 50%), sugerindo que a exposição do homem ao fungo seja mais freqüente do que se imagina habitualmente.

2.6 – EPIDEMIOLOGIA DA CRIPTOCOCOSE

No Brasil, a criptococose causada por *C. neoformans* ocorre em todas as regiões, entretanto, *C. gattii* comporta-se como um patógeno primário infectando hospedeiros nativos e principalmente pessoas jovens e crianças nas regiões Norte e Nordeste. Neste grupo de pacientes, a infecção é caracterizada por alta taxa de letalidade que varia de 40,6% a 56% (Correa et al. 1999, Lazera et al. 2005) e freqüentemente causa incapacidades (déficits visuais ou cegueira) e hidrocefalias (Rozenbaum & Gonçalves 1994, Nishikawa et al. 2003).

Dados epidemiológicos brasileiros, através da análise da distribuição dos tipos moleculares de *C. neoformans* e *C. gattii*, sugerem uma geografia macro-

regional, norte-sul com tendência a infecções por *C.gattii*. A macro-região Norte, que inclui os estados do Amazonas, Roraima, Pernambuco, Piauí e Bahia é considerada endêmica para *C.gattii*. A macro região Sul, que é representada pelos estados do Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul, apresenta esporádicas infecções por *C. gattii* (Trilles et al. 2008).

2.6.1 – Epidemiologia da Criptococose por ***Cryptococcus neoformans***

Historicamente a criptococose foi descoberta, descrita e estudada através de sua face oportunística, associada ao sarcoma, a linfomas, uso de corticóides, uso de drogas imunossupressoras no curso de transplantes e, atualmente, é uma das principais co-morbidades associadas à aids.

Epidemiologicamente mostra-se como um marcador de hospedeiros com imunodeficiência celular, sendo seu agente, *C. neoformans* sorotipo A, amplamente disperso no meio ambiente do mundo todo. Presente em focos urbanos, associado às aves e seus habitats adaptados às construções humanas, como pombos, aves em parques, lojas comerciais e domicílios, como periquitos e canários (Passoni et al., 1998; Filiú et al., 2002; Barone et al., 2006) e ocos de árvores.

Este agente mostra-se amplamente adaptado ao viver humano, capaz de reproduzir-se por expansão clonal e sobreviver em substratos secos, protegido da iluminação direta. Encontrado, por exemplo, na poeira domiciliar de cerca de 13% de domicílios do Rio de Janeiro e também em gaiolas de pássaros domésticos (Passoni et al., 1998), sendo fácil sua dispersão aérea e subsequente inalação pelos hospedeiros.

Estudo no Rio de Janeiro mostrou risco aumentado de adquirir criptococose para moradores com aids em casas contaminadas, quando comparado ao de pacientes com aids residentes em domicílios onde a poeira não estava contaminada (Passoni et al., 1998). Este sorotipo A também é encontrado em ambientes rurais e já foi isolado do cacaueteiro e árvore nativa de mata amazônica, indicando habitats

naturais em áreas preservadas ou com pouca intervenção humana, provavelmente seu nicho ecológico primário (Lazera et al., 2000; Lazera et al., 2005).

Em diferentes regiões brasileiras, este agente foi isolado de madeira em decomposição, em árvores tropicais, nativas ou introduzidas no Brasil, como cássia rosa (*Cassia grandis*), cássia amarela (*Senna multijuga*), fícus (*Ficus microcarpa*), jambolão (*Syzygium jambolana*), cacauzeiro (*Theobroma cacao*), cabori (*Miroxylum peruiferum*), sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides*), *Adenantha peregrina* (Lazera et al., 1993, 1996 e 2000; Restrepo et al., 2000; Montenegro et al., 2000; Reimão et al., 2007). Pode sobreviver por muitos anos em oco de árvore em ambientes urbanos, conforme estudo recente no Campus da FIOCRUZ (Barbosa et al., 2007).

A presença de isolados sorotipo AD sugere que *C. neoformans* sorotipo A possa interagir no meio ambiente com *C. neoformans* sorotipo D e produzir recombinantes ou híbridos AD. Tanto o sorotipo D, como o AD, são encontrados em menor frequência do que o sorotipo A, em habitats como ocos de árvores e em excretas de pombos e outras aves. De forma correspondente, estes sorotipos D e AD podem também ser oportunistas, ocorrendo em diferentes regiões do Brasil (Nishikawa et al., 2003, Trilles et al., 2003, Casalli et al., 2003).

2.6.2 - Epidemiologia da Criptococose por ***Cryptococcus gattii***

O habitat natural de *C. gattii* foi inicialmente associado a restos vegetais de *Eucalyptus camaldulensis* na Austrália (Ellis & Pfeiffer, 1990), mas o conceito original proposto, de uma associação específica entre ambos já não cabe, frente aos achados que se seguiram. No Brasil, *C. gattii* foi encontrado em eucaliptos no parque Ibirapuera, na cidade de São Paulo, e em plantação experimental de *E. camaldulensis* da Embrapa, em Teresina, Piauí (Montenegro et al., 2000; Nishikawa et al., 2003), bem como em árvores tropicais como cássia rosa, oiti, ficus, mulungu, “guetarda” (Lazera et al., 1998, 2000, Fortes et al., 2001).

Também foi encontrado na Colômbia em algodoeiro de praia (Callejas et al., 1998), no Canadá, em árvores como elmo, cedro, pinheiro e carvalho, mas não em eucalipto (Kidd et al., 2004). Portanto, não há habitat ou associação específica de *C. gattii* com árvores-hospedeiras, mas sim, padrões geográficos de ocorrência do fungo em madeira em decomposição, substrato onde ambas as espécies, *C. gattii* e *C. neoformans*, podem estar presentes em diferentes proporções (Lazera et al., 2000).

A criptococose por *C. gattii* predomina em regiões tropicais e subtropicais, ocorrendo na América Latina (Brasil, Argentina, Peru, Colômbia, Venezuela, México), sul dos Estados Unidos, países da África Central, Austrália, Nova Guiné e sudeste da Ásia (Kwon-Chung & Bennett 1992; Lazera et al., 2005).

No Brasil, estudos clínico-epidemiológicos mostram a importância da criptococose por *C. gattii* no SNC nas regiões N e NE, atingindo importante contingente de crianças, adolescentes e adultos jovens de ambos os sexos, com letalidade de 35% a 40% (Cavalcanti 1995; Correa et al., 1999; Santos, 2000; Darzé et al., 2000; Nishikawa et al., 2003; Martins, 2004; Lazera et al., 2005). Nestas regiões, também chama a atenção a ausência do diagnóstico de formas clínicas mais brandas, como formas restritas ao pulmão, o que parece indicar um importante sub-diagnóstico da doença.

A percepção da importância da criptococose por *C. gattii* é crescente; se antes era vista como problema restrito a grupos populacionais rurais ou nativos, atualmente identifica-se sua ocorrência em diversas regiões onde surjam condições laboratoriais para o diagnóstico e discriminação das espécies de *Cryptococcus*.

Os primeiros casos, no Brasil, de criptococose infantil descritos por Corrêa, em Belém, chamaram a atenção para a ocorrência e gravidade da meningoencefalite em crianças HIV-negativas nesta região da Amazônia (Correa et al., 1999). Estudos em andamento mostram o predomínio da criptococose por *C. gattii* sobre a criptococose por *C. neoformans* em centro de referência em Belém do Pará (Santos et al., 2005), onde a maioria absoluta apresenta lesão de SNC.

Estudos ambientais evidenciaram a presença dos dois agentes (*C. gattii* e *C. neoformans*) em ocos de árvores (Costa et al. 2003), na poeira coletada no interior de domicílios e em raspados de madeira em decomposição obtido de tábuas utilizadas na construção de casas da cidade de Belém (Costa et al., 2004). No quintal de uma destas casas foi identificado também *C. neoformans* sorotipo D, presente em elevadas concentrações em artrópodes coletados entre tábuas empilhadas (Costa et al., 2007).

Estes achados mostram um ciclo biológico complexo dos agentes da criptococose, adaptados a ambiente domiciliar localizado em área pobre, cuja população usa madeira de refugo para a maioria de suas construções, sob regime de chuva diária e elevada umidade relativa do ar. Nestas condições, observa-se acelerado processo de decomposição de substratos de madeira não tratada, propiciando íntimo e prolongado contato homem-fungo e atingindo todas as faixas etárias, incluindo as crianças. Portanto, é bem provável que basidiósporos formados na madeira por *C. neoformans* e/ou *C. gattii* sejam inalados no cotidiano destes domicílios, causando infecção pulmonar assintomática, pneumonia ou disseminando para o sistema nervoso central.

É preciso ampliar os estudos sobre a criptococose e seus agentes na Amazônia e no Nordeste do Brasil, buscar o diagnóstico precoce, principalmente em crianças destas regiões, bem como identificar tipos moleculares predominantes em infecções humanas e animais, e no meio ambiente.

2.6.3 - Epidemiologia dos **Surtos por *Cryptococcus gattii***

Surtos por *C. gattii* em animais foram descritos como pneumonia em cabras na Espanha (Baró et al., 1998) e forma disseminada em psitacídeos de diferentes espécies em aviário no interior do estado de São Paulo (Raso et al., 2004). Também recentemente foi registrado o maior surto por *C. gattii*, na ilha de Vancouver, Canadá (Kidd et al., 2004), atingindo 38 casos humanos, entre 1999 e 2001, a maioria hospedeiros imunocompetentes, 58% do sexo masculino, 72% com lesão pulmonar, 26% com lesão de SNC e letalidade e em torno de 10% (Kidd et al., 2004).

Ainda em Vancouver, o mesmo surto atingiu 35 animais, incluindo 18 gatos, 17 cães, seis golfinhos (*Phocoenidae dalli*), dois furões e duas lhamas. Chama a atenção neste caso o predomínio de manifestações pulmonares nos humanos atingidos, pneumonia criptocócica, com moderada disseminação para o SNC, baixa letalidade e diagnóstico precoce da micose. A emergência de um patógeno considerado tipicamente tropical ou subtropical em área temperada chama a atenção para mudanças ecológicas e climáticas e, conseqüentemente, também da distribuição geográfica de *C. gattii*. O aumento acelerado e global da temperatura em nosso planeta nas últimas décadas, incluindo regiões do Canadá, pode estar relacionado à expansão deste agente, bem como a mudança de sua virulência (Kidd et al., 2004).

No caso do surto de Vancouver, é possível que a ativação do ciclo sexuado tenha propiciado recombinantes, surgimento de variantes mais virulentas, dispersão através de propágulos sexuados (basidiósporos) e expansão geográfica para novos habitats (Fraser et al., 2005). Como conseqüência, a criptococose por *C. gattii* passou a ser doença de notificação compulsória no Canadá e foi proposto estudo de cooperação e vigilância da infecção por este agente. Temos notícia de que os casos continuam a ocorrer em Vancouver, sugerindo que a continuidade do fenômeno possa torná-la endêmica (Waters, 2007).

2.6.4 - Epidemiologia molecular

Estudos de tipagem molecular dos agentes da criptococose têm utilizado diferentes métodos em amplas séries de isolados de origem humana, animal e ambiental, como: 1- PCR-*fingerprinting* (RAPD-PCR com iniciador M13) e RFLP do gene URA5 segundo Meyer et al. (1999 e 2003), que permitem identificar os tipos moleculares VN de *C. neoformans* e VG de *C. gattii*. 2- AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*), segundo Boekhout (2001), que identificam genótipos. Comparados, estes dois métodos mostram correspondência entre si, bem como relação com sorotipos. Assim, *C. neoformans* corresponde aos genótipos: VN1/AFLP1, sorotipo A; VNII/AFLP1A, sorotipo A; VNIII/AFLP3, sorotipo AD; e VNIV/AFLP2, sorotipo D; e *C. gattii* corresponde aos genótipos: VG1/AFLP4, sorotipo B; VGII/AFLP6, sorotipo B; VGIII/AFLP5, sorotipo B; e VGIV/AFLP7, sorotipo C (Kidd et al., 2004). Note-se que a correspondência com sorotipos restringe-se ao predomínio observado nas séries analisadas, mas não há padrão molecular específico de sorotipo, principalmente para *C. gattii*.

Os tipos VNI e VGI predominam no mundo como agentes de criptococose, mas, na América Latina a distribuição e ocorrência de tipos moleculares de *C. gattii* mostra-se diferente dos demais continentes (Meyer et al., 2003; Trilles et al., 2003; Boekhout 2001). Isolados clínicos e ambientais no Brasil mostram considerável diversidade genética de ambas as espécies, demonstrando ocorrência simultânea de diferentes tipos/genótipos (VNI/AFLP1, VNIV/AFLP2 e VGII/AFLP6) em ocos de árvores; e que diferentes gêneros de árvores e substratos de madeira, bem como tocas de animais, podem ser fonte de infecção humana.

Estudo retrospectivo dos tipos moleculares de *C. neoformans* e *C. gattii* circulantes no Brasil sugere diferenças regionais na distribuição destes genótipos. Assim, as regiões S e SE do Brasil apresentam como tipo molecular predominante VNI, atingindo, sobretudo pacientes imunocomprometidos, principalmente os com AIDS (Igreja et al., 2004; Matsumoto et al., 2007). Diferentemente, no N e NE o agente mais comum é o tipo VGII sorotipo B, demonstrando ser endêmico nestas

regiões, causando doença principalmente em pacientes imunocompetentes. Este mesmo tipo molecular VGII foi o responsável pela epidemia no Canadá, identificado na grande maioria dos isolados clínicos (humanos e animais) e ambientais.

2.7 - A PATOGENIA

Os fatores que induzem a patogenicidade do *C. neoformans* são divididos em dois grupos: um relacionado às características do estabelecimento de infecção no hospedeiro e capacitação de sobrevivência do parasita no mesmo, e outro relacionado aos fatores de virulência propriamente ditos afetando o grau de patogenicidade (Buchanan & Murphy, 1998).

A infecção por *C. neoformans* é adquirida através da inalação de propágulos de origem ambiental, representados por leveduras desidratadas, de pequeno diâmetro e facilmente aerossolizadas (Levitz, 1991), promovendo desde colonização, infecção subclínica até infecções sintomáticas extensas (Duperval et al., 1977). O fungo, pode causar comprometimento em um ou mais órgãos, tendo preferência por localizar-se no sistema nervoso central. As manifestações clínicas mais comuns são a neurocriptococose, a criptococose pulmonar e a infecção disseminada.

Para transpor as barreiras existentes no trato respiratório e depositar-se nos alvéolos pulmonares, o microrganismo deve produzir formas viáveis de tamanhos compatíveis com um diâmetro médio menor que 4µm. Isso ocorre através da reprodução sexuada, onde há produção de basidiósporos de tamanhos entre 1,8 a 3µm. Para o crescimento do fungo nos tecidos do hospedeiro é necessário transpor as condições fisiológicas existentes no sítio de infecção. Ele deve crescer a 37°C, numa concentração de gás carbônico aproximadamente de 5% e pH entre 7,3 e 7,4. Para o crescimento a 37°C, o fungo deve expressar a subunidade catalítica A da proteína calcineurina, fosfatase específica para serinas e treoninas, sendo esta ativada por Ca⁺² calmodulina e envolvida na resposta ao estresse do fungo. Essa proteína tem papel fundamental para o crescimento do microrganismo no hospedeiro e é necessária à sua patogenicidade (Buchanan & Murphy, 1998)

Ao disseminar-se hematogenicamente *C. neoformans* tem especial tropismo pelo sistema nervoso central. Os mecanismos de defesa do hospedeiro contra a criptococose permitem compreender que provavelmente o neurotropismo é uma forma de escape do agente, visto que a reposta fagocítica é diminuída e a atividade do complemento é ausente no líquido cefalorradiano (LCR). Possivelmente, isso leva a uma deficiência local dos fatores quimiotáticos e opsonizantes. Além disso, o próprio LCR propociona um adequado meio de crescimento para o fungo devido à presença de aminoácidos, a dopamina que serve de substrato para produção de melanina, um reconhecido fator de virulência (Diamond, 1996).

O resultado da infecção varia em função do tamanho do inóculo, do estado imunológico do hospedeiro e de fatores de virulência da cepa. A interação destes fatores para determinar precisamente os resultados da infecção, permanece pouco entendida, por ser extremamente complexa.

Cryptococcus neoformans sintetiza três outros produtos que podem afetar a resposta imune: (1) manitol, (2) melanina, e (3) prostaglandina. Produz manitol nos tecidos que podem interferir na morte oxidativa de células fagocíticas (Chaturvedi et al., 1996). Também pode sintetizar melanina *in vitro* a partir de precursores fenólicos, utilizando uma enzima do tipo lacase (Williamson, 1994). Já a produção de melanina em tecidos tem sido documentada durante infecção experimental tanto de roedores quanto em infecções de humanos (Nosanchuk et al., 2000; Rosas et al., 2000). Acredita-se que a melanina contribui para a virulência por proteger as células fúngicas contra mecanismos oxidativos e não oxidativos das células efectoras. A melanina também pode agir como um imunomodulador por baixar a regulação da resposta imune celular no pulmão (Huffnagle et al., 1995). Recentemente foi demonstrado *C. neoformans* como produtor de prostaglandina *in vitro*, podendo modular a resposta imune se ela for produzida *in vivo* (Noverr et al., 2001).

A partir da década de 30, estudos realizados por Benham, objetivando a caracterização antigênica, foram iniciados. Entretanto, somente na década de 50 foram descritos os primeiros sorotipos (A, B e C), identificados por Evans ao utilizar reação de aglutinação e de precipitação a partir da reação capsular com antisoro de coelho. Nesse estudo ficou demonstrada a importância da cápsula para determinação de sorotipagem (Evans, 1950; Evans & Kessel, 1951). Em 1968, o

sorotipo D foi descrito por Wilson et al. O sorotipo AD, descoberto posteriormente, apresentando caracterização mais rara que os sorotipos já identificados (Nishikawa, 2000).

A entidade capsular é um complexo polissacarídeo com um determinante de alto peso molecular, abundante em sua estrutura e de importante reatividade antigênica: a glucuronoxilomanana (GXM). Esta, além de determinar o sorotipo, acumula-se nos fluídos corpóreos como a urina, soro e líquido céfalo-raquidiano (LCR), constituindo fator de diagnóstico da micose por meio de testes específicos como ELISA (ensaio de imun absorvância enzimática) e aglutinação por partículas de látex, segundo Richardson & Warnock (1997).

A cápsula polissacarídica atua na resistência à fagocitose mediada por macrófagos, neutrófilos e monócitos (Alspaugh et al., 1998), sendo decorrente do potencial zeta negativo dos componentes capsulares, o que provoca repulsão eletrostática. Resulta na diminuição da fagocitose, diminuindo a apresentação de antígenos nas células T, acarretando diminuição da resposta imunológica. Essa cápsula também interfere na presença dos componentes do complemento impossibilitando a ligação aos receptores CR3 dos leucócitos e prejudicando a resposta leucocitária (Buchanan & Murphy, 1998). Concentrações de bicarbonato e gás carbônico em condições fisiológicas normais humanas também induzem a produção da cápsula. De modo semelhante, baixas taxas de ferro levam à intensa elaboração da estrutura capsular por parte do fungo (Perfect et al., 1998).

Estudos experimentais revelam que leveduras acapsuladas sofrem ação de monócitos e macrófagos, facilmente ocorrendo o processo de fagocitose (Small & Mitchell, 1986, 1989), e que, mediante a transferência de células do *cryptococcus neoformans* de cultivo *in vitro* para o estado parasitário, tanto a cápsula quanto a parede celular aumentam de tamanho e de síntese enzimática. Em parasitismo, o grau de espessura capsular está diretamente relacionado com o órgão comprometido, sendo, entretanto, passível de reversibilidade (Rivera et al., 1998).

O fungo é capaz de produzir, em meio de cultura e durante a infecção, o poliol D-manitol. Este manitol pode ser tanto utilizado como secretado pelo *C. neoformans*. A quantidade do poliol secretada está relacionada com a quantidade de microorganismos presentes no sítio da infecção, apresentando-se como osmólito ou

antioxidante durante o processo da infecção. A produção de manitol pelas células do *C. neoformans* no local da infecção é responsável pelo aumento da resistência ao estresse provocado por choque térmico, diferenças osmóticas, dano por formas reativas de oxigênio e ataque mediado por polimorfonucleares, com conseqüente aumento da patogenicidade (Perfect et al., 1998).

A enzima urease é secretada pelo fungo em condições normais de crescimento tanto no meio ambiente quanto em quadros patológicos. Uma metaloenzima catalisa a hidrólise da uréia a amônia e carbamato. Essa enzima tem importância durante a infecção no pulmão, levando a diferentes respostas teciduais em casos de mutantes não-produtoras de uréase (Casadevall & Perfect, 1998). Outras enzimas que atuam como fator de virulência no *C. neoformans* são as proteases e a fosfolipase. O mecanismo de virulência através das proteases é o início da invasão dos tecidos do hospedeiro e da destruição das proteínas de cunho imunológico (Aoki et al., 1994). Já a enzima fosfolipase atua degradando membranas celulares das células do hospedeiro, com conseqüente penetração tecidual (Cox et al., 2001).

Outra característica do *C. neoformans* é a capacidade de sintetizar melanina, através de substratos específicos (Polak, 1989). A enzima responsável pela formação de precursores envolvidos na síntese de melanina é uma fenoxidase intracelular, caracterizada como uma lacase. Essa classe de enzimas pertence à família das oxidases, que tem como co-fator os íons cobre e ferro. A síntese de melanina está condicionada à existência de DOPA exógena, que é transportada para o meio intracelular. Essa melanina criptocócica tem sido observada como um fator de virulência. Localiza-se na parede celular do fungo e confere à célula um efeito protetor contra reações oxidativas, atuando na defesa contra a radiação UV e o ataque das células de defesa (Hamilton & Holdom, 1999).

Estudos com células fagocíticas primárias (macrófagos) e eventualmente (neutrófilos) isoladas demonstraram que *C. neoformans* sobrevive e replica-se intracelularmente em alguns sistemas como macrófagos alveolares, sugerindo que o mesmo pode ser um patógeno intracelular facultativo *in vitro* (Diamond & Bennett, 1973; Bulmer & Tacker, 1975; Lee et al., 1995).

Células destruidoras naturais (NK), neutrófilos, eosinófilos e certos tipos de linfócitos, têm cada vez mais sido relatadas como mediadoras diretas de efeitos antifúngicos *in vitro*, sugerindo que elas contribuem para a defesa do hospedeiro (Casadevall, 1998).

Feldmesser et al. (2000), realizaram estudos em camundongos e mostraram que a cápsula de mucopolissacarídeo não prevenia a fagocitose *in vivo* e que as células da levedura sobrevivem e replicam-se dentro do macrófago, depois da fusão fagolisossomal. Os resultados demonstraram que a infecção pulmonar é um processo altamente dinâmico, pelo qual a posição das células muda, durante o curso da infecção em função da reprodução intracelular e do grau de inflamação.

Anticorpos para glicosylceramide e melanina em células da parede fúngica têm sido estudados experimentalmente, evidenciando que o curso da infecção é modificado pelos mesmos, sugerindo que existe um outro alvo para a imunidade humoral em adição a cápsula de polissacarídeo (Rodrigues et al., 2000; Rosas et al., 2001).

2.8 - A PATOLOGIA

A interação, do agente com o hospedeiro é muito variável, podendo manifestar-se como colonização de superfícies mucosa das vias aéreas e árvore respiratória, até quadros de invasão tecidual. Também, podem ocorrer colonizações sem que ocorra a doença e, os locais no organismo com maiores suscetibilidades são: a orofaringe, narinas, escarro, pele e interdígitos dos pés (McGinnis, 1975).

Em humanos, a infecção por *C. neoformans* nos pulmões está associada à formação de um complexo primário, que consiste em um nódulo subpleural granulomatoso (Baker, 1976).

Grande parte das infecções naturais não é reconhecida clínica ou radiologicamente. São evidenciadas por pequenos nódulos pulmonares residuais, contendo formas do agente e constituem achados de histopatologia, evidenciando criptococose pulmonar em regressão. Parte de indivíduos infectados desenvolve criptococose pulmonar progressiva, de duas maneiras: ocupação ou invasão do parênquima pulmonar. A ocupação assintomática é representada por uma coleção uniforme do fungo, encistada em meio ao parênquima, causando uma reação inflamatória mínima, do parênquima adjacente. Já no tipo invasivo, há reações inflamatórias provocadas pelo fungo, que comumente se manifestam por sintomas de infecção respiratória inespecífica, acompanhada ou não de sintomas gerais de intensidade variável, compondo quadros polimórficos (Goldman et al., 2000).

Respostas granulomatosas estão associadas com a predominância de formas intracelulares, uma vez que no abscesso de inflamação criptocócica pode crescer massa fúngica extracelular. Esta é grosseiramente visível em tecidos e podem ter uma aparência de espuma de sabão (Schwartz, 1988). Tal fato evidencia que o *C. neoformans* pode sobreviver em macrófagos por períodos prolongados de tempo (Goldman & Lee, 2000).

A radiografia do tórax em hospedeiros normais é aparentemente bem definida, sem calcificação, nódulos pulmonares simples ou múltiplos, indistintos infiltrados parecidos com massa, linfadenopatia hilar, efusões pleurais e cavitação pulmonar (Feigin, 1983).

Em hospedeiros severamente comprometidos, a pneumonia criptocócica pode progredir rapidamente, e a habilidade de disseminar-se de focos primários do pulmão para o sistema nervoso central varia de paciente para paciente, tanto quanto de uma síndrome pulmonar para manifestações meníngeas (Kerkering et al., 1981). Alguns pacientes, entretanto, desenvolvem uma pneumonia criptocócica com característica de síndrome da angústia respiratória do adulto (SARA) sem envolvimento do sistema nervoso central (Henson & Hill, 1984; Murray et al., 1988).

Exames histológicos de *Cryptococcus* spp. infectando tecidos puderam revelar diversas respostas inflamatórias, tais como reação tecidual por intensa

inflamação granulomatosa, lembrando uma necrose caseosa (Schwartz, 1988). Nos tecidos infectados, foi revelado que os macrófagos estão intimamente associados com a criptococose (Levitz, 1994). Os macrófagos alveolares são provavelmente as primeiras células imunes efetoras encontradas ao se inalar o *Cryptococcus* (Huffnagle et al., 1997; Levitz & Di Benedetto, 1989).

2.8.1 – Técnicas para coloração de lâminas no estudo histopatológico

A coloração por hemotoxilina-eosina (HE) é utilizada na rotina do diagnóstico histológico sendo de grande utilidade na avaliação dos padrões de reações teciduais (Harding et al., 1979; Lacaz et al., 2002).

A Grocott, coloração também chamada de impregnação pela prata é a mais sensível, sendo largamente utilizada na pesquisa dos elementos fungicos tanto nos cortes de tecidos, quanto nos esfregaços, corando de negro a parede celular, que é visualizada sobre um fundo verde-claro (Kwon-Chung et al., 1981; Lacaz et al., 2002).

A utilização da coloração Mucicarmim de Meyer tem por objetivo diferenciar o *Cryptococcus* de outros fungos similares em tamanho e forma. É o método exclusivo de visualização do material polissacarídeo capsular. O carmim liga-se a mucina, a qual se destaca dos outros componentes celulares pela coloração magenta (Lazcano et al., 1991; Chandler & Watts, 1997; Lacaz et al., 2002).

2.82 - Aspectos Clínicos em Seres Humanos, Animais e Aves

No homem a criptococose pode se apresentar de forma localizada ou generalizada (Rozenbaum e Gonçalves, 1994; Pappalardo e Melhem, 2003), sendo na maioria das vezes, diagnosticada na forma disseminada (Rozenbaum e Gonçalves, 1994). Os propágulos colonizam primariamente os pulmões podendo causar doença aguda, subaguda ou crônica e, subseqüentemente, invadem o SNC,

podendo acarretar quadros de meningite, encefalite ou meningoencefalite (Casadevall e Perfect, 1998; Casali *et al.*, 2001). Outros tecidos também são afetados, especialmente em indivíduos infectados pela aids ou em terapia imunossupressora drástica (Mitchell e Perfect, 1995). A maioria dos casos de infecção cutânea é decorrente da doença disseminada (Casadevall e Perfect, 1998).

Apesar de o pulmão ser a porta de entrada do patógeno no organismo, a pneumonia raramente manifesta sinais clínicos, sendo a meningoencefalite a forma clínica mais comum da doença (Calvo *et al.*, 1991; Rozenbaum e Gonçalves, 1994; Mitchell e Perfect, 1995). As leveduras podem permanecer latentes e serem reativadas por um evento imunocomprometedor (Abegg, 2003).

Em estudos realizados por Rozenbaum e Gonçalves (1994), observou-se que 91,8% dos pacientes apresentavam criptococose disseminada e apenas 8,2% apresentavam criptococose pulmonar. Aproximadamente 70 a 90% dos pacientes com aids e neurocriptococose possuíam sinais e sintomas de meningite ou meningoencefalite subaguda, como cefaléia, náusea, vômito, febre, rigidez de nuca, letargia, alterações no estado mental, distúrbio na personalidade, perda de memória, lesões em nervos cranianos, déficits visuais e outros, os quais ocorrem duas a quatro semanas antes do estabelecimento do diagnóstico. Grandes criptococomas pulmonares e cerebrais são comumente associados a *C. gattii* (Calvo *et al.*, 1991; Rozenbaum e Gonçalves, 1994; Mitchell e Perfect, 1995; Darzé *et al.*, 2000; Fernandes *et al.*, 2000; Casal *et al.*, 2003; Pappalardo e Melhem, 2003).

A doença pode estar associada a outras infecções fúngicas, especialmente candidíase oral, dermatofitose, pitiríase versicolor, pneumocistose, paracoccidiodomicose ou histoplasmose e doenças oportunistas, incluindo a tuberculose e equinococose (Mitchell e Perfect, 1995; Darzé *et al.*, 2000; Fernandes *et al.*, 2000; Casali *et al.*, 2003; Pappalardo e Melhem, 2003).

O neurotropismo da levedura, além de possibilitar a evasão ao sistema imune do hospedeiro, pode ser explicado pela grande quantidade de catecolamina existente no SNC, que serve de substrato para a enzima fenoloxidase, sendo que a melanina protege o agente da atividade oxidante do SNC (Mitchell e Perfect, 1995).

A prevalência da criptococose parece ser igual ou até mesmo maior em animais de companhia quando comparada a de seres humanos (Malik *et al.*, 1995, 1997). A espécie felina é a mais acometida (Malik *et al.*, 1995, 1997; Kerl, 2003) sendo que, em gatos, a criptococose é a micose sistêmica mais comum em países de clima temperado (Kerl, 2003) e a segunda mais comum no Brasil, perdendo somente para esporotricose (Larsson, 2000). Não foram evidenciados fatores predisponentes para criptococose em animais, entretanto a leucemia viral felina e a imunodeficiência adquirida felina parecem ser desfavoráveis ao tratamento em gatos (Kerl, 2003).

A criptococose atinge cães adultos jovens, com idade média de dois anos, de ambos os sexos, de raças de grande porte, sem haver sazonalidade para o aparecimento dos sinais. Tal como ocorre no homem, *C. neoformans* é o responsável pela maioria das infecções e os animais infectados por *C. gattii* são pertencentes ao meio rural ou áreas suburbanas (Flatland *et al.*, 1996; Kerl, 2003).

Segundo Malik *et al.* (1995), a rinosinusite é a infecção primária na maioria dos cães e gatos, envolvendo a porção caudal da cavidade nasal e seios nasais, atingindo o SNC através da placa cribiforme ou por via hematogena.

Os sinais envolvem as vias aéreas superiores (cavidade e plano nasal, ossos turbinados nasais, seios frontais, ossos e tecido subcutâneo, além do aparelho nasolacrimal e linfonodos), SNC e/ou bulbo ocular (MALIK *et al.*, 1995) e incluem deformidade nasal e facial, tumores protuberantes, corrimento nasal, espirro, estridores nasais e mudanças na fonação. A cegueira pode ser causada por descolamento de retina e coriorretinite granulomatosa. A meningoencefalite é caracterizada por depressão, paresia, papiledema, convulsão, ataxia, andar em círculo, cefaléia, dor toraco-lombar e cervical, distúrbios vestibulares e envolvimento múltiplo dos nervos cranianos. As vias aéreas inferiores são raramente afetadas e as lesões cutâneas aparecem em 50% dos gatos. Além disso, sinais inespecíficos podem incluir perda de peso, febre, letargia e anorexia, como resultado de doença crônica (Mailk *et al.*, 1995; Flatland *et al.*, 1996; Kerl, 2003).

Embora estando presente em grande número no ambiente das aves, *Cryptococcus* spp. não causa doença nesses animais, na maioria das vezes, devido à alta temperatura corporal das aves, a qual inibe o crescimento da levedura (Bauwens *et al.*, 1986; Nigro *et al.*, 1987; Mitchell e Perfect, 1995) e da baixa capacidade de invasão sistêmica do fungo nessas espécies. A infecção subclínica, com subsequente erradicação da levedura no organismo pela imunidade celular intacta também pode ocorrer (Connolly *et al.*, 1999). Neste caso, as aves poderiam funcionar como reservatório transitório e portadores assintomáticos da doença.

3.0 - Materiais e Métodos

Estudo experimental desenvolvido na Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, envolvendo o Serviço de Micologia Médica do Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas - IPEC e o Laboratório de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz – IOC, tendo sido submetidos ao Comitê Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-FIOCRUZ), sob o protocolo número 0250/05.

3.1 - CULTURA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Os fungos *Cryptococcus neoformans* (isolado LMM 736) sorotipo A (*MAT* α), VN I/AFLP 1, e *Cryptococcus gattii* (isolado LMM 21) sorotipo B (*MAT* α), VG II/AFLP 6, caracterizado como previamente descrito (Kidd et al.,2004), ambos isolados de pacientes HIV no Rio de Janeiro, Brasil, foram cedidos pela coleção de cultura do serviço de micologia médica, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC/FIOCRUZ), Rio de Janeiro.

Os cultivos foram feitos em agar saboraud dextrose 2% a partir de uma população estoque conservada à -70°C e incubada por 48 horas a 37°C. As células fungicas foram diluídas em salina (NaCl 0,9%) estéril e contadas usando câmara de Neubauer até a obtenção de uma contagem de colônias estimada em 10⁵ UFC/mL.

3.2 – ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados 70 camundongos *Swiss Webster*, imunocompetente, machos, oriundos do Centro de Criação de Animais de Laboratório - CECAL/Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, com peso corporal entre 20 e 30g. Os animais foram alojados em (7 gaiolas distintas, com 10 animais) e colocados em estantes assépticas com controle de temperatura, umidade, ventilação e luz ambiente recebendo água e comida *ad libitum*.

3. 3 - CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em três (03) grupos:

1 - Grupo *Cryptococcus neoformans* (Cn)

Trinta camundongos foram submetidos à instilação intra-traqueal com 50 µL de solução concentrada (10^5 UFC/mL) da cepa de *Cryptococcus neoformans* sorotipo A (Mat α) VN I/AFLP 1.

2 - Grupo *Cryptococcus gattii* (Cg)

Trinta camundongos foram submetidos à instilação intra-traqueal com 50 µL de solução concentrada (10^5 UFC/mL) da cepa de *Cryptococcus gattii* sorotipo B (Mat α) VG II/AFLP 6.

3 - Grupo Controle (Ctrl)

Dez camundongos foram submetidos à instilação intra-traqueal de 50 µL de solução estéril de NaCl 0,9%.

Após a instilação intratraqueal, cada um dos grupos acima, foi subdividido em cinco subgrupos correspondentes aos tempos de realização do estudo (2, 12, 24, 48 e 72 horas).

3. 4 - PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Todos os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de uma mistura contendo 50 µL de cloridrato de cetamina (Ketalar 100 mg) (Park-Davies and Co. Bogotá, Colombia) e xilazina (20 mg) (Bayer S.A., Brasil).

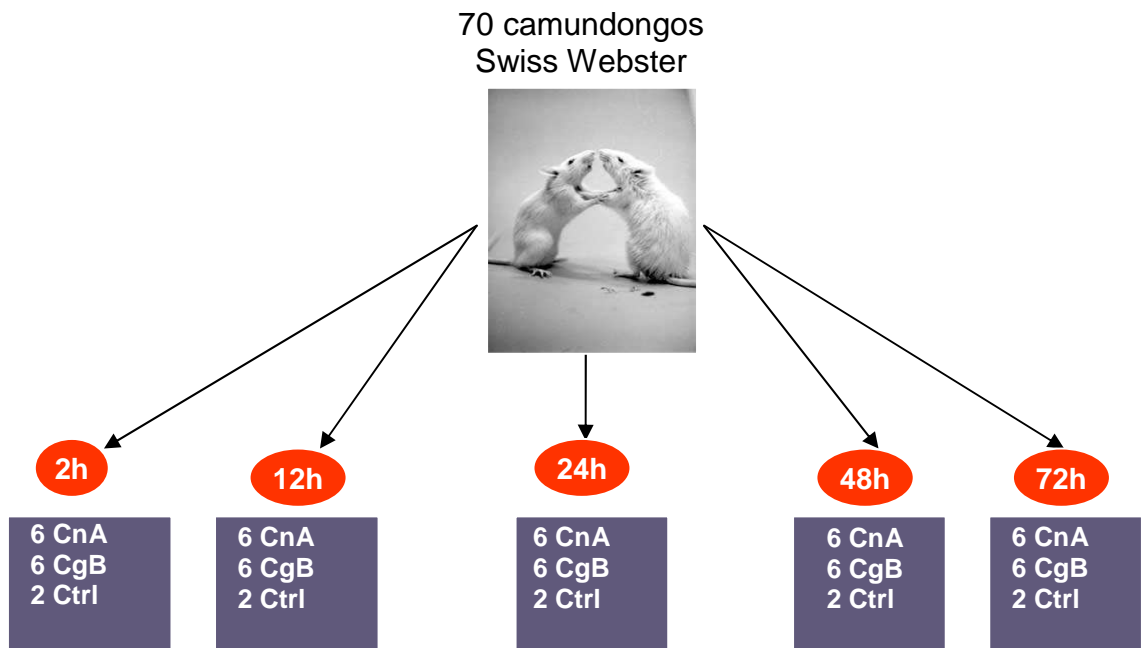
Posteriormente, os camundongos foram colocados em uma pequena mesa em decúbito dorsal e seus membros fixados por esparadrapos. Após os animais atingirem o plano anestésico e realizarem assepsias cervical, foram feitas incisões medianas nas regiões cervicais anteriores ficando suas traquéias expostas e cada animal instilado intra-traquealmente, com uma seringa de 1 mL contendo: a) 10^5 UFC/mL de *C. neoformans* diluídas em 50 μ L de solução salina (30 animais); b) 10^5 UFC/mL de *C. gatti* diluídas em 50 μ L de solução salina (30 animais); ou 50 μ L de solução salina sem células fungicas (10 animais), em dose única. Posteriormente foram realizadas suturas das regiões cervicais, com Cat gut 5.0. Todos estes procedimentos foram realizados em Cabine de Segurança Biológica Classe II B II.

Após a instilação, o abdômen de cada camundongo foi comprimido e liberado para promover uma inalação profunda.

Os animais utilizados nos experimentos foram submetidos a eutanásia por injeção intra-peritoneal de 1,0 mL de pentobarbital sódico a 2,5% (Abbott Laboratories, Chicago, IL, E.U.A) e, colocados em uma pequena mesa dentro da Cabine de Segurança Biológica Classe II B II, em decúbito dorsal e sendo seus membros fixados por esparadrapo. Os membros superiores foram mantidos estendidos a 90 graus em relação ao corpo e os membros inferiores estendidos em diagonal.

Para cada animal, os pulmões foram retirados e fixados em formalina Milloning de Carson (Carson et al., 1973) com posterior inclusão em parafina. Os órgãos foram submetidos à microtomia (5 μ m), corados com hematoxilina-eosina (H&E), Lennert's Giemsa e Sirius red (pH= 10.2) para determinar o tipo e a intensidade da resposta inflamatória. Para detectar as estruturas fungicas os tecidos foram corados com Silver methenamine (Grocott), Mucicarmin e Ácido Peróxido de Schiff (PAS). Todos os cortes foram examinados por microscópio de campo claro (Photomi, Zeiss) e as imagens adquiridas com uma câmara digital Hamamatsu C5810.

3.5 - DESUNHO DO ESTUDO



4.0 - Resultados

Todos os camundongos Swiss Wester, instilados intratraquealmente com 10^5 células fungicas de ambas as espécies, desenvolveram criptococose pulmonar.

Os camundongos Swiss Wester, instilados intratraquealmente com salina não apresentaram alterações histopatológicas.

4.1 - Achados histopatológicos do pulmão

Todos os camundongos instilados com cepas de *C. neoformans* e *C. gattii*, tiveram distribuição segmentar do fungo em espaços aéreos bronquiolar, alveolar e no parênquima tecidual, produzindo reação inflamatória localizada. Também apresentaram acúmulos de células polimorfonucleares (PMN), constituindo extensa massa inespecífica.

4.1.2 - Infecção pulmonar por *Cryptococcus gattii* (Cg):

Após 2 horas da infecção, grande quantidade de células de *C. gattii*, sem expressar cápsula, estava presente no brônquio, bronquíolos e alvéolos. Foram observadas pequenas células fungicas entrando em alguns alvéolos e fixando-se na parede do epitélio bronquiolar sem mudar suas formas principais (Fig. 4.1). Neste momento, não foi observado infiltrado inflamatório, apesar da presença de alguns neutrófilos e monócitos maduros. Algumas células de *C. gattii* interagiram com a parede brônquica, às vezes sendo internalizados pela camada epitelial (Fig. 4.2).

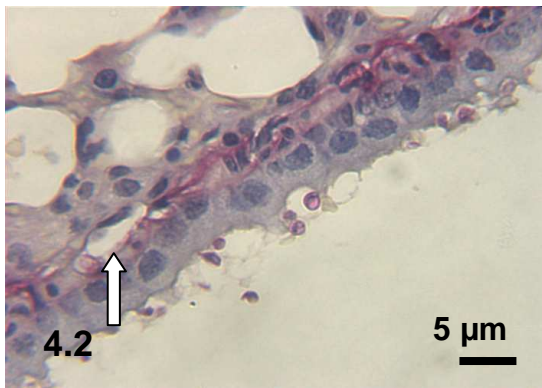
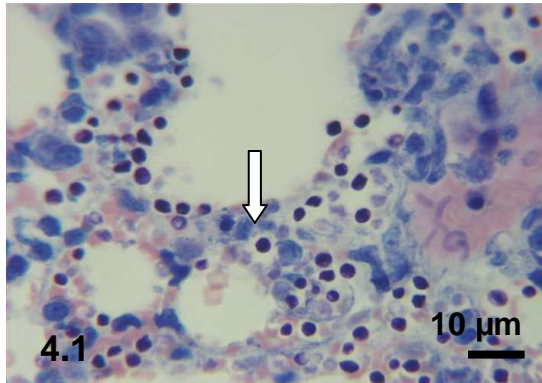
Em 12 horas após a infecção, várias células de *C. gattii* começam a apresentar cápsula e brotamento (Fig. 4.3). Células fungicas encapsuladas mostraram adesão preferencial por pneumócitos do tipo II. O padrão inflamatório com infiltrado pneumônico focal mostrou-se moderado em relação ao observado nos pulmões 2 horas pós-infecção (Fig. 4.4).

Depois de 24 horas da infecção, o padrão de infecção continuou sendo focal, embora neste momento tenha sido observado um grande número de células de *C. gattii* encapsuladas dentro de um grande infiltrado inflamatório neutrofílico. Também foram detectadas infecções focais, com atelectasias alveolares. Outros eventos foram marcados pelo crescimento de células fungicas aderidas ao bronquíolo formando massas compactas (rolhas) de células de *C. gattii* e, células epiteliais e mucosas descamadas, caracterizando destruição do epitélio bronquiolar (Figs. 4.5 e 4.6).

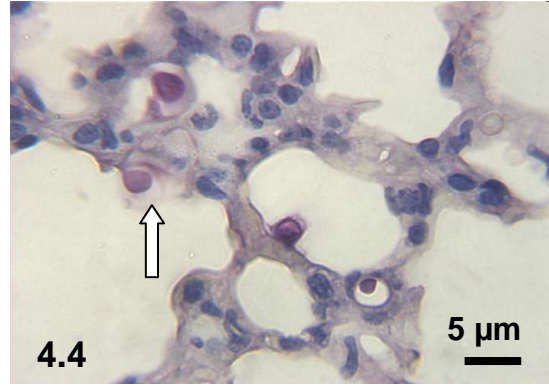
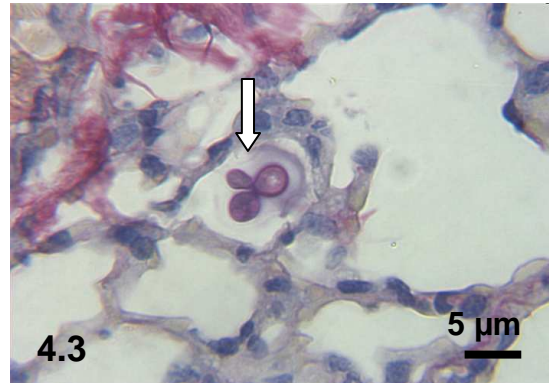
A expansão da cápsula causou atelectasia nas vias aéreas, 48 horas após a infecção. Células encapsuladas de *C. gattii* dispersas, foram observadas nos alvéolos, sem infiltrados peri-alveolares. Observou-se também, uma formação de massa compacta semelhante à vista dentro do bronquíolo, em 24 após a infecção (Fig. 4.7). Estas células encapsuladas pareciam ser internalizadas através do epitélio bronquiolar (Fig. 4.8).

Ao final de 72 horas da infecção, os fungos ficaram maiores, com enorme cápsula, com diferentes respostas a coloração, algumas positivas ao Sirius Red e outras negativas. Persiste a adesão do fungo, bem como a formação de massa compacta junto à mucosa, dentro do brônquio (Fig. 4.9). Foi observada grande quantidade de células de *C. gattii* ao redor das artérias brônquicas e no território linfático (Fig. 4.10). Foram vistos macrófagos hiperplásticos espumosos, alguns contendo partículas fungicas (Figs. 4.11 e 4.12). O epitélio brônquico mostrou-se hiperplástico e contendo enorme quantidade de material PAS-positivo. Algumas células fungicas foram vistas livres dentro de vasos sanguíneos (Fig.4.10), circulando com o sangue.

***C. gattii* 2h**

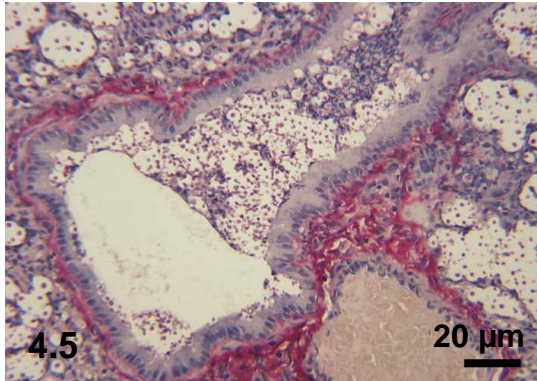


***C. gattii* 12h**

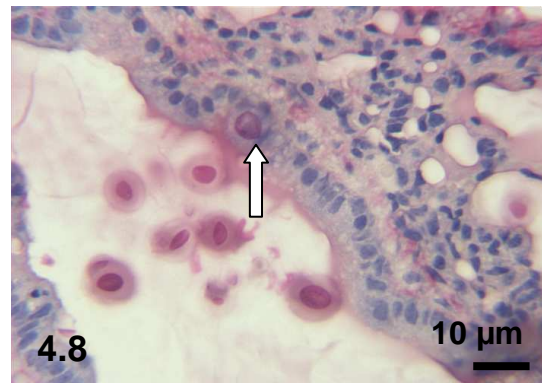
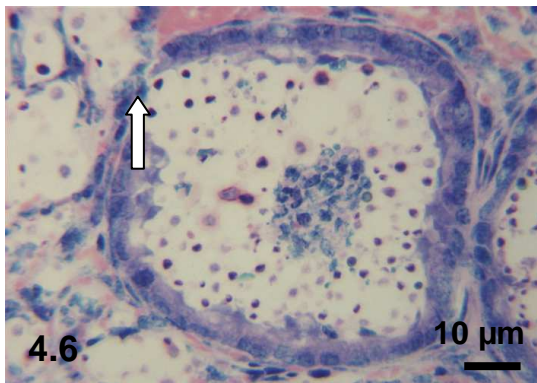
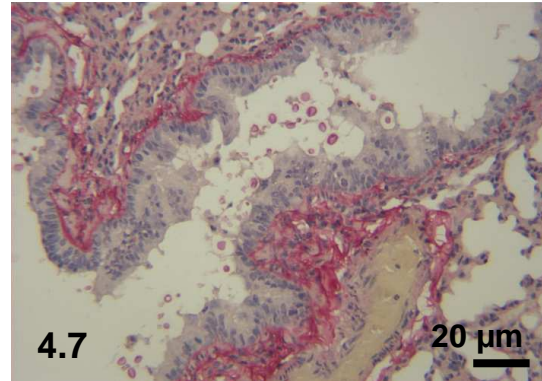


Prancha I: Cortes histológicos dos pulmões de camundongos Swiss webster instilados intratraquealmente com 10^5 células fungicas de *C. gattii*, 2h p.i. Fig. 4.1 – Mostra presença do fungo (sem mudanças morfológicas) em brônquios, bronquíolos e alvéolos ou aderidos à parede do epitélio – **ver seta** (corado por Giemsa). Fig. 4.2 – Mostra células de *C. gattii* interagindo com a parede brônquica, às vezes sendo internalizado através da camada epitelial – **ver seta** (corado por Sirius red). Fig. 4.3 – Mostra células apresentadndo cápsula e começando a brotar, em 12h p.i., (corado por Sirius red). Fig. 4.4 – Mostra células encapsuladas do fungo com adesão preferencial por pneumocitos II – **ver seta** (corado por Sirius red).

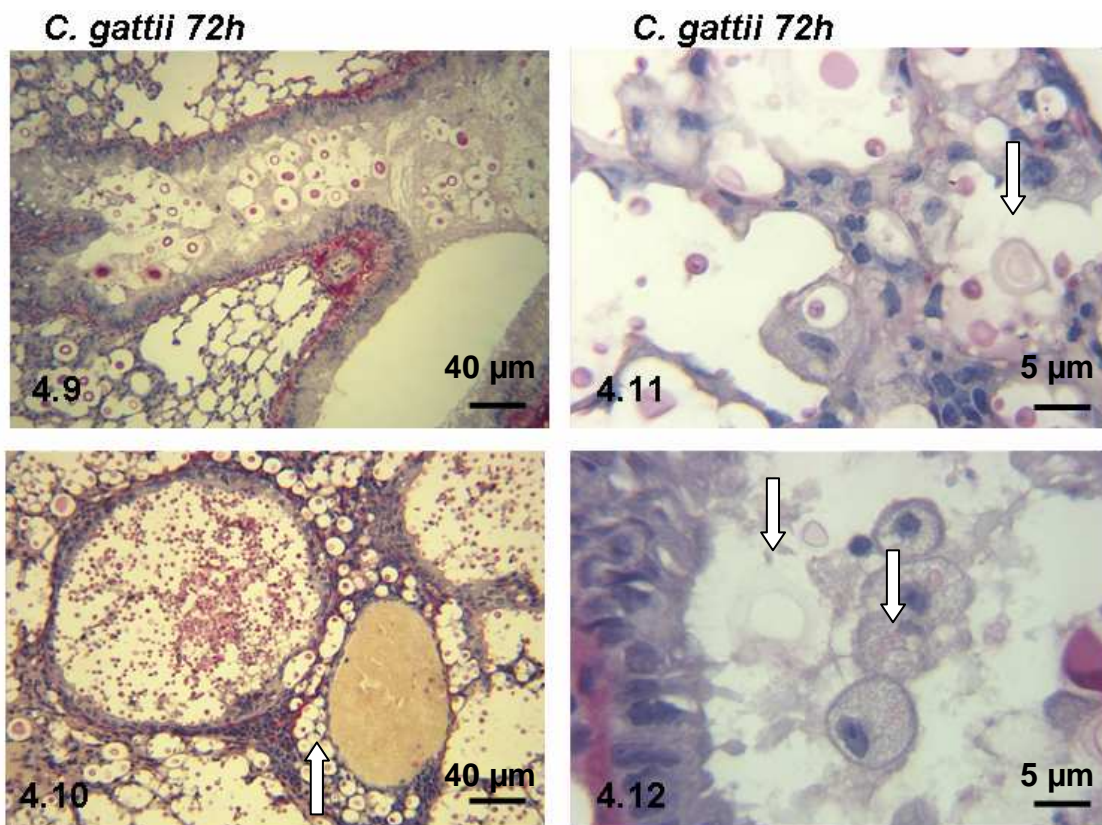
***C. gattii* 24h**



***C. gattii* 48h**



Prancha II: Cortes histopatológicos dos pulmões de camundongos Swiss webster instilados intratraquealmente com 10^5 células fungicas de *C. gattii*. Fig. 4.5 – Mostra em 24 p.i., um grande número de células encapsuladas de *C.gattii* dentro de um infiltrado inflamatório maior no lúmen dos bronquíolos e alvéolos, bem como, infecções focais com atelectasia, (corado por Sirius red). Fig. 4.6 – Células fungicas aderidas ao brônquio formando massa compacta por *C. gattii* e células destacadas do epitélio da mucosa, caracterizando dano do epitélio brônquico, 24h p.i. – **ver seta** (corado por Giemsa). Fig. 4.7 – Em 48h p.i., mostra uma formação de massa, dentro do brônquio, semelhante à observada em 24h p.i. (corado por Sirius red). Fig. 4.8 – Mostra células encapsuladas de *C. gattii* sendo internalizadas através do epitélio brônquico, 48h p.i. – **ver seta** (corado por Sirius red).



Prancha III: Cortes histopatológicos dos pulmões de camundongos Swiss webster instilados intratraquealmente com 10^5 células fungicas de *C. gattii*, 72h p.i. Fig. 4.9 – Mostra obstrução brônquica, causada por formação de massa junto com muco e células fungicas (corado por Sirius red). Fig. 4.10 – Mostra células de *C. gattii* ao redor da artéria brônquica e território linfático – **ver seta** (corado por Sirius red). Figs. 4.11/4.12 – Mostram macrófagos hiperplásticos espumosos, alguns contendo partículas fungicas no lúmen dos alvéolos e brônquios – **ver seta** (corado por Sirius red).

4.1.3 – Infecção pulmonar por *Cryptococcus neoformans* (Cn):

A infecção produzida neste grupo se caracterizou por mostrar um grande número de células fungicas, no interior do trato respiratório em períodos precoces.

Após 2 horas da infecção, as células fungicas exibiram forma e tamanho semelhantes aos mantidos *in vitro*; utilizados para a inoculação. Neste momento, os fungos foram localizados no interior da árvore respiratória, inclusive em nível de vias aéreas superiores, laringe, traquéia, brônquios e bronquíolos, se distribuído aleatoriamente em grupos ou isoladamente. Alguns deles, especialmente se aderiram ao epitélio brônquico, bronquiolar e alvéolos, exibindo uma expansão da cápsula (Fig. 4.13) e outros atravessaram as células do epitélio brônquico, promovendo dano local e permitindo que fungos alcançassem o tecido peri-brônquico (Fig. 4.14). Neste tempo foi observada variação no tamanho das células de *C.neoformans*, com aparecimento de pequenas formas brotando, indicativo de multiplicação extracelular “*in vivo*” (Figs. 4.13 e 4.14).

Em 12 horas após a infecção, a maioria das células de *C.neoformans*, mostrou formas encapsuladas maiores, fixadas na parede brônquica ou nos espaços alveolares. Também foram observadas massas compactas (rolhas) de células de *C.neoformans*, dentro da luz brônquica, bloqueando parcial ou totalmente a via aérea (Fig. 4.15). Em algumas áreas pulmonares as leveduras de *C.neoformans* mostram projeções radiais dentro da cápsula (Fig. 4.16). Neste momento brotos aparecem dentro de intensas reações inflamatórias, com linfócitos, neutrófilos, monócitos e células plasmáticas (Fig. 4.16).

O número de células de *C.neoformans* ainda persistiu aumentado com intenso brotamento, 24 horas pós-infecção, acompanhado de intensa reação inflamatória, bem maior que a observado após 12 horas da infecção. Também foram observadas células de *C.neoformans* brônquicas e peri-brônquicas dentro de um intenso infiltrado neutrofílico, caracterizando uma pneumonia supurativa (Figs. 4.17 e 4.18).

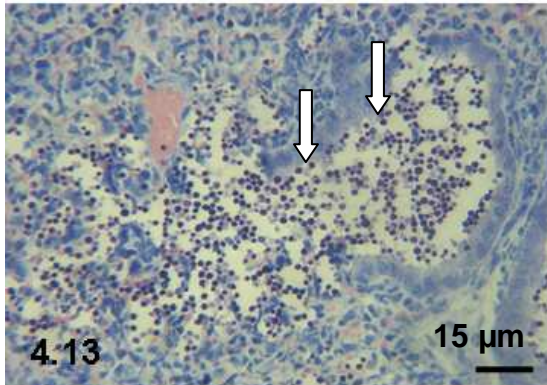
Depois de 48 horas da infecção, foi observada uma diminuição no número de células de *C.neoformans* bem como um decréscimo progressivo na extensão da inflamação (Fig. 4.19) e muitos macrófagos pareciam espumosos, poucos deles contendo elementos fungicos (Fig. 4.20). Também foram observadas células fungicas dentro do brônquio, artéria brônquica e área peri-brônquica, sugerindo penetração através de vasos linfáticos (Fig. 4.19). Alguns macrófagos pareciam incapazes de envolver as células fungicas e fagocitá-las (Figs. 4.19 e 4.20).

Passadas às 72 horas da infecção, as mesmas obstruções de vias aéreas e distribuições peri-bronquiolares (peri-linfáticas) foram observadas (Figs. 4.21 e 4.22). As figuras 4.23 e 4.24 mostram células de *C.neoformans* interagindo com o epitélio bronquiolar apresentando-se com maiores tamanhos que os macrófagos.

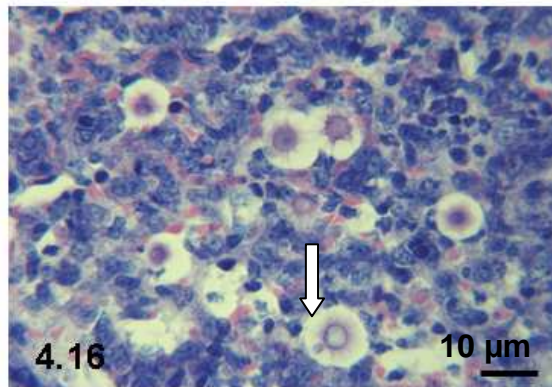
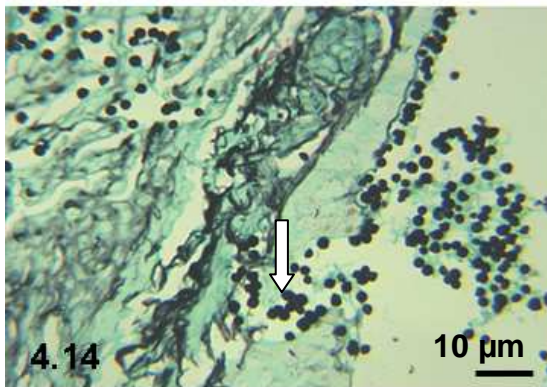
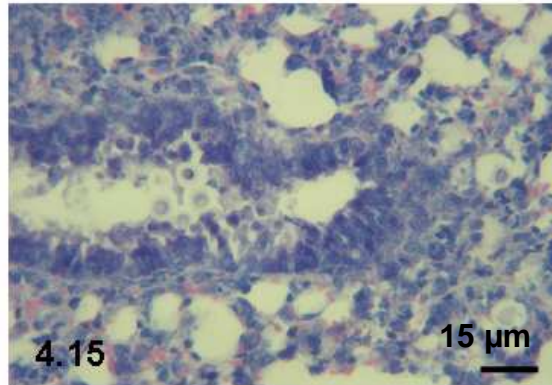
Foram observadas células fungicas promovendo lesões teciduais, desde o epitélio brônquico, passando pelos bronquíolos e alvéolos. Também foram observadas células de *C. gattii* com adesão preferencial pelos pneumócitos II (Fig.4.4) e rara observação de células gigantes (Fig.4.3).

Após esta cinética histopatológica, foi possível observar que ambas as espécies (*C. gattii* e *C. neoformans*) apresentaram vias linfáticas e hematogênicas como importante formas de disseminação (Figs. 4.10 e 4.19).

C. neoformans 2h



C. neoformans 12h

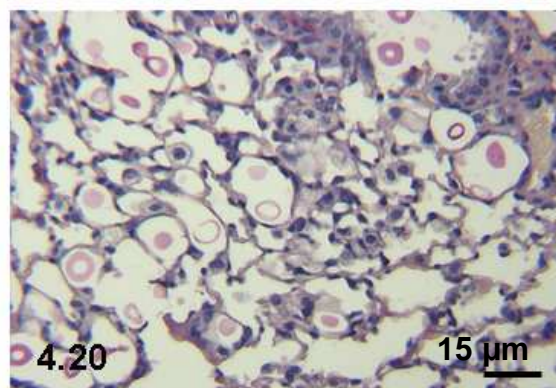
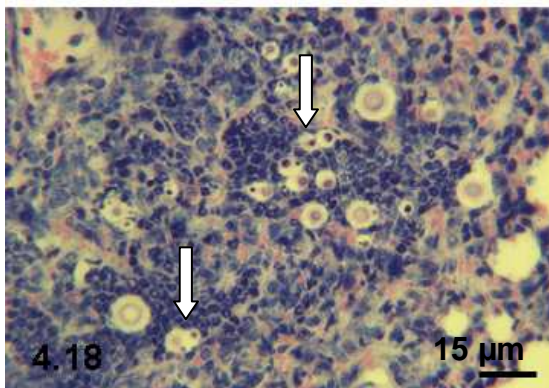


Prancha IV - Cortes histopatológicos dos pulmões de camundongos Swiss webster instilados intratraquealmente com 10^5 células fungicas de *C. neoformans*. Fig. 4.13 – Mostra em 2h p.i. o fungo situado no lúmen da árvore respiratória e aderido ao epitélio brônquico, já exibindo uma expansão da cápsula – **ver seta** (corado por Giemsa). Fig. 4.14 – Mostra variação de tamanho das células de *C. neoformans*, nos alvéolos e bronquíolos, com o aparecimento de pequenas formas brotando, indicativo de multiplicação celular “*in vivo*”, também foram observadas outras células passando através do epitélio brônquico causando dano tecidual local – **ver seta** (corado por Grocott). Fig. 4.15 – Mostra formas encapsuladas maiores de *C. neoformans*, aderidas ao epitélio ou dentro dos espaços alveolares. Observadas células fungicas constituindo massa compacta de *C. neoformans* dentro do lúmen brônquico, bloqueando parcial ou totalmente a via aérea, 12h p.i. (corado por Giemsa). Fig. 4.16 – Mostra em 12h p.i., células de *C. neoformans* com brotamentos dentro de uma intensa reação inflamatória, contendo linfócitos, neutrófilos, monócitos e células plasmáticas – **ver seta** (corado por Giemsa).

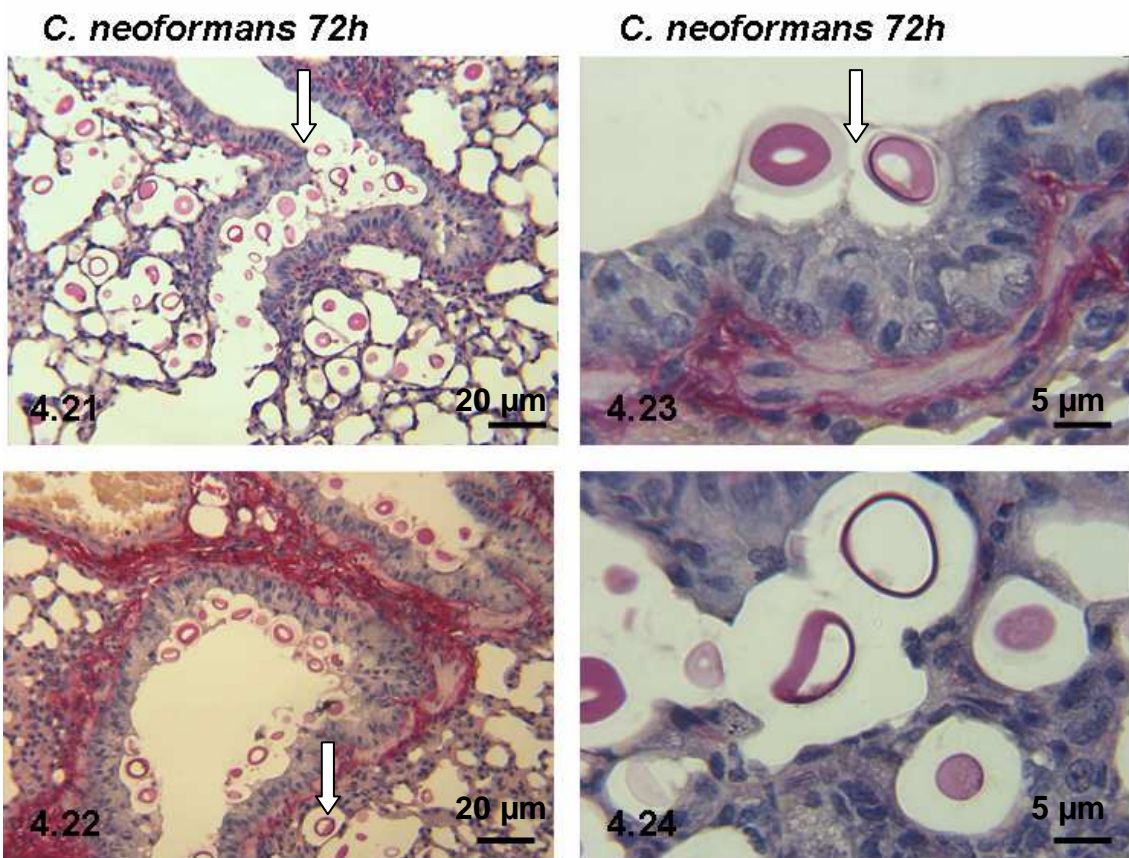
***C. neoformans* 24h**



***C. neoformans* 48h**



Prancha V - Cortes histopatológicos dos pulmões de camundongos Swiss webster instilados intratraquealmente com 10^5 células fungicas de *C. neoformans*. Fig. 4.17 – Mostra, em 24h p.i., um maior número de células de *C. neoformans* com brotamentos, acompanhado por intensa reação inflamatória maior que a observada em 12h p.i. Apresenta também, células de *C. neoformans* dentro de grande infiltrado neutrofílico, caracterizando uma pneumonia supurativa (corado por Giemsa). Fig. 4.18 – Mostra células de *C. neoformans* dentro de intenso infiltrado neutrofílico, com várias células apresentando cápsula e começando a brotar, 24h p.i. – **ver seta** (corado por Giemsa). Fig. 4.19 – Mostra uma diminuição no número de células de *C. neoformans*, bem como, diminuição progressiva na extensão da inflamação – **ver seta**. Células de *C. neoformans* foram observadas dentro do brônquio, artéria brônquica e área peri-brônquica, sugerindo invasão por território linfático, 48h p.i. (corado por sirius red). Fig. 4. 20 – Mostra macrófagos com aparência espumosa, contendo elementos fungicos 48h p.i. (corado por Sirius red).



Prancha VI - Cortes histopatológicos dos pulmões de camundongos Swiss webster instilados intratraquealmente com 10^5 células fungicas de *C. neoformans*. Figs. 4. 21/ 4.22 – Mostram a mesma obstrução de via aérea por massa fungica compacta e distribuição peri-arterial (peri-linfática), 72h p.i. **ver seta** (corado por Sirius red). Figs. 4.23/4.24 – Mostram células de *C. neoformans*, muito maiores que macrófagos, interagindo com epitélio brônquico sem fagocitose, 72h p.i. **ver seta** (corado por Sirius red).

5. 0 - Discussão

A instilação intratraqueal resultou em deposição rápida de cepas nos alvéolos. Após 2h, células das cepas de *C. neoformans* ou *C. gattii*, foram vistas dentro do parênquima pulmonar, indicando rápida penetração a nível alveolar.

A via de infecção eleita baseou-se em estudos laboratoriais ainda não publicados, que demonstram ser de melhor distribuição pulmonar as inoculações intratraqueais com acesso através do anel cartilaginoso após incisão cervical, quando comparadas às tentativas por manobras de entubação oro-traqueal. A relevância reside em oferecer uma alternativa de modelo experimental, a partir da instilação intratraqueal de ambas as espécies do fungo (*C. neoformans* e *C. gattii*), podendo simular as condições de exposição da via inalatória de indivíduos supostamente saudáveis, com o agente patológico da criptococose.

A comparação entre os pulmões de camundongos infectados por *C. neoformans* ou *C. gattii* revelaram peculiaridades importantes. Uma das diferenças principais foi a expressão precoce (2h p.i) da cápsula de polissacarídeo por *C. neoformans* em comparação com *C. gattii* (12h p.i). Por causa da expressão precoce da sua cápsula de polissacarídeo, *C. neoformans* é maior em tamanho (Fig. 4.16), o que pode contribuir para seu escape dos mecanismos de defesa do hospedeiro e maior persistência no trato respiratório. Este mecanismo de escape e a conseqüente dificuldade para difusão resultam numa grande reação inflamatória local acompanhada de brotamento precoce.

Em contraste, *C. gattii* foi observado em formas de cepas menores no parênquima pulmonar (Fig. 4.1), causando uma reação inflamatória fraca que também favorece o escape dos fungos permitindo sua difusão precoce. A cápsula polissacarídica de glicuronoxylomanana (GXM) do *C. neoformans* foi mostrada interferindo na migração de neutrófilos e o 6-O-acetylated mannose de GXM é um motivo crucial para a inibição do recrutamento de neutrófilos (Ellerbroek et al., 2004). Este efeito é devido à interferência de GXM em ambos, neutrófilos e células endoteliais (Ellerbroek et al., 2002).

Os resultados da presente pesquisa demonstram que *C. gattii* está envolvido mais precocemente nas lesões brônquicas e que ambas as espécies produzem atelectasia como resultado da expansão de sua cápsula de polissacarídeo dentro dos alvéolos. Entretanto, *C. gattii* e *C. neoformans* mostram semelhanças relativas à adesão para o epitélio brônquico e bronquiolar. Tais resultados sugerem a existência de tropismo do fungo para o epitélio respiratório. Isto poderia ser mediado através de moléculas específicas (ligantes/receptores), que poderá ser objeto de futuro estudos.

A observação de células de *C. gattii* com adesão preferencial pelos pneumócitos II (Fig.4.4), sinaliza que tal evento necessita de maiores pesquisas, pois a superfície alveolar pulmonar é protegida com um fluído que quebra a tensão superficial, o surfactante, que é composto principalmente por fosfolipídeos, mas também contém proteínas multiméricas chamadas colectinas e fazem parte do sistema imune inato. Um destas proteínas, SP-D, contém um domínio que liga carboidrato e podem interagir com glicoconjugantes presentes na superfície de micro-organismos patogênicos, inclusive o componente capsular (GXM) glicuronoxylomanana (Van de Wetering et al., 2004).

Os resultados deste trabalho apontam para duas diferentes vias de disseminação de *Cryptococcus*: 1) Penetração através de capilares alveolares e 2) invasão através artérias justa-brônquica e/ou linfáticas. Na situação anterior, o fungo pode partir dos sacos alveolares, e por transposição da barreira através dos pneumócitos eles podem alcançar os septos e capilares alveolares. No segundo eles podem aderir longe do lúmen bronquiolar, transpor o epitélio e o tecido conectivo peribronquial e periarterial ou perilinfático, invadindo a parede do vaso. Eles também podem sair dos sacos alveolares adjacentes para os vasos. Atividades de proteinases extracelulares foram estudadas em oito cepas de *C. neoformans* e duas cepas de *C. gattii*. Todas as cepas estudadas produziram atividades proteolíticas extracelulares (Chen et al., 1996). *C. neoformans* podem produzir aspartil, serina protease e metaloprotease semelhante à alastinolítica metaloprotease de *Aspergillus fumigatus* (Yoo et al., 2004; Eigenheer et al., 2007; Pinti et al., 2007).

Estudos prévios conduzidos com modelos experimentais de silicose e paracoccidiodimicose relatam que histiócitos capturaram partículas fungicas e então as disseminavam por via hematogênica (Gonzalez et al., 2005). Em nosso estudo, entretanto, macrófagos com corpos fagocíticos contendo fungos foram muito incomuns. A observação de células gigantes também foi muito rara. O brotamento de cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* ocorreu independentemente de fagocitose macrofágica, como o verificado “in vitro” por Feldmesser et al. (2000). Ademais, o presente estudo sugere a importância de eventos extracelulares durante estágios precoces da invasão pulmonar por *C. neoformans* e *C. gattii* como parte do processo.

Ambas as cepas, *C. neoformans* e *C. gattii* expressaram uma cápsula de polissacarídeo após elas aderirem ao epitélio respiratório. Isto reforça que a presença da cápsula dentro dos pulmões pode contribuir para o sucesso do estabelecimento da infecção pulmonar, e que o tamanho da cápsula poderá inibir a fagocitose, tendo um papel significativo destruindo o epitélio e, aumentando a penetração no hospedeiro. A cápsula de polissacarídeo de *Cryptococcus* é necessária para a sobrevivência do fungo *in vivo*. Liberação de componentes capsulares está previamente associada a dono e doença no hospedeiro (Steenbergen & Casadevall, 2003). Recentes estudos sugerem um novo mecanismo pelo qual cápsulas de polissacarídeo empacotados em vesículas lipídicas cruzam a parede da célula e alcançam o ambiente extracelular (Rodrigues et al., 2007).

Não sabemos o significado molecular das mudanças morfológicas (cor e forma) observada na cápsula de polissacarídeo durante diferentes momentos da infecção. Projeções radiais apareceram com sombras distintas coradas de vermelho com Sirius red dentro da cápsula, bem com formas distintas de estrutura de fungica, também foram detectadas, sugerindo alguns aspectos dinâmicos da secreção fungica como foi descrito por Rodrigues et al. (2008).

Predominantemente, cepas de *C. neoformans* produzem doença em hospedeiros imune-comprometidos e cepas de *C. gattii* em imune-competentes (Casadevall, Perfect, 1998; Banerjee, Data e Casadevall, 2004; Rozenbaum et al., 1990), produzindo entidades clínicas distintas, assim sugerindo patogêneses distintas. Os mecanismos usados por cada cepa em doença natural são difíceis de

comparar “*in vivo*” devido às diferenças marcadas em estado imune dos hospedeiros afetados. Assim foram utilizados animais imunocompetentes para comparar diferentes respostas histopatológicas entre as cepas. Os camundongos imunocompetentes permitiram evidenciar reações inflamatórias locais mais conspícuas e capacidade de obstrução pelas cepas de *C. neoformans* nas vias aéreas respiratórias e alvéolos, comparando a uma resposta menos inflamatória do hospedeiro provocada por cepas de *C. gattii*. Entretanto, esta cepa apresentou uma capacidade invasiva mais alta das paredes bronquiolar e alveolar, seguida por mais intenso acesso vascular dos fungos à circulação. A diferença nas características da cápsula entre as cepas pode ser um fator diferencial importante relacionado à patogênese. Realmente, a cápsula de *C. neoformans* é considerada um fator de virulência por causa de suas propriedades antifagocíticas e fungos acapsulados aderem significativamente mais a células endoteliais causando maior dano a células endoteliais que os organismos encapsulados (Ibrahim et al., 1995).

A cepa de *C. neoformans* utilizada em nosso modelo animal foi sorotipo A, correspondendo ao tipo molecular mais comum (genótipo VNI/AFLPI) associado a AIDS no mundo. A cepa de *C. gattii* usada foi uma molecular (genótipo VGII/AFLP6), a mais comum na América latina, endêmica nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, relacionada aos recentes casos na Espanha e Vancouver, considerada um tipo virulento. De qualquer maneira, diferenças em virulência observada em cepas individuais devem ser consideradas, sendo necessários futuros estudos experimentais analisando melhor as cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* (Kidd et al., 2004; Baró et al., 1998; Raso et al., 2004).

6.0 - Conclusão

Neste contexto podemos concluir que:

- Na infecção pulmonar, as células da cepa *C. neoformans* expressaram suas cápsulas de polissacarídeo logo após 2h da instilação intratraqueal, diferentemente das células da cepa *C. gattii* que não apresentaram tal alteração morfofuncional.

- A invasão pulmonar e o mecanismo de disseminação das cepas *C. neoformans* e *C. gattii* no trato respiratório na fase precoce da infecção experimental, não dependeram diretamente da participação de células polimorfonucleares (neutrófilos) e monocleares (macrófagos).

- A invasão pulmonar e o mecanismo de disseminação das cepas *C. neoformans* e *C. gattii* aconteceram, em parte, pela interação física entre os fungos e o epitélio respiratório, contudo, sendo desconhecido os mecanismos intrínsecos.

- Os pneumócitos II podem ter papel importante no processo de adesão e internalização fungica.

- Esses dados sugerem que a adesão de ambas as cepas *C. neoformans* e *C. gattii* seguida de internalização, pode potencialmente determinar a lesão do pulmão e os mecanismos de disseminação.

- O alto inóculo foi crítico para o modelo de infecção, dos camundongos imunocompetentes aqui analisados, e pode esclarecer a patogenia e eventos precoces da disseminação criptocócica por *C. gattii* em hospedeiros normais recentemente descritas em humanos e surtos animais (Kidd et al., 2004; Raso et al., 2004).

Perspectivas de publicação

Encaminhamos o primeiro manuscrito intitulado “HISTOPATHOLOGIC STUDY OF THE EARLY INFECTION BY *Cryptococcus neoformans* OR *Cryptococcus gattii* IN RESPIRATORY TRACT OF EXPERIMENTALLY INFECTED SWISS WEBSTER MICE”, para apreciação e posterior publicação na revista *Medical Mycology* contido no Apêndice I.

HISTOPATHOLOGIC STUDY OF THE EARLY INFECTION BY *Cryptococcus neoformans* OR *Cryptococcus gattii* IN RESPIRATORY TRACT OF EXPERIMENTALLY INFECTED SWISS WEBSTER MICE

LOURENÇO M.G.F*, LAZÉRA M.S**, WANKE B**, LENZI H.L** AND PELAJO-MACHADO M**

*Universidade do Estado do Pará (UEPA), Belém/ PA, Brazil;

**Mycology Laboratory, Evandro Chagas Clinical Research Institute, Rio de Janeiro/ RJ, Brazil

*+Laboratory of Pathology, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro/ RJ, Brazil.

Key words: *Cryptococcus neoformans*; *C. gattii*; pathogenic mechanisms; experimental infection; pulmonary invasion

Summary

Backgrounds/Aims: As the pathogenic mechanisms involved in the early stages of lung infection by *Cryptococcus* species are still poorly known, we followed separately the process of internalization in the lung in immunocompetent mice, describing its penetration and comparing possible differences. The involvement of central nervous system (CNS) with meningitis has been traditionally reported in both *C. neoformans* and *C. gattii* infections, with or without clinical or radiological signs of pulmonary lesion. Almost all disseminated forms by *C. neoformans* strains occur in immunocompromised individuals, except in a few cases without known predisposing factor, suggesting the existence of some escape mechanisms. In contrast, cryptococcosis by *C. gattii* almost always affects individuals with no identifiable immune impairment, and commonly presents, beside meningitis, CNS and pulmonary mass lesions. **Materials and Methods:** Animals were intratracheally instilled with: a) 10^5 yeast cells of *C. neoformans* in 50 μ L of saline (30 animals); b) 10^5 yeast cells of *C. gattii* in 50 μ L of saline (30 animals); or c) 50 μ L of saline without fungi (10 animals). After instillation, mice abdomen was compressed and released to cause deep inhalation. Animals were killed at 2, 12, 24, 48 and 72 hours post-instillation (p.i.). At each period, mice were killed by intraperitoneal injection of 1.0 mL of 2.5% sodium penthotal. **Conclusion:** Pulmonary invasion and dissemination mechanism of *Cryptococcus* at the respiratory tract level and early stage of the experimental infection does not depend directly on the participation of neutrophils and mononuclear cells. That process takes place, in part, through the physical interaction between the fungi and the respiratory epithelium, being the intrinsic mechanisms yet unknown.

Corresponding author: Dr. Marcelo Pelajo-Machado, M.D., Ph.D.
Laboratory of Pathology
Instituto Oswaldo Cruz (IOC)
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)
Av. Brasil, 4365 – Pav. Gomes de Faria, Manguinhos
21040-900 - Rio de Janeiro/RJ, Brazil
e-mail: mpelajo@ioc.fiocruz.br
tel/fax: (+5521) 2598 4350

INTRODUCTION

The incidence of invasive fungal disease has drastically increased over the past few decades corresponding to the rising number of immunocompromised patients. The major risk factors for severe fungal disease include administration of broad-spectrum antibiotics, corticosteroids and cytotoxic agents, invasive medical procedures, and HIV infection. The rise in fungal infection incidence has led researchers to identify virulence determinants and to ask why environmental fungi may cause disease (1, 2, 8, 10, 11, 12,13).

Cryptococcosis is a worldwide distributed, life-threatening mycosis, caused by zoopathogenic basidiomycetous yeasts. At present, based on phenotypical and biological concepts, two distinct species of *Cryptococcus* are proposed as their etiologic agents: *C. neoformans* (serotypes A, D, and AD) and *C. gattii* (serotypes B and C) (14, 15, 16). Molecular typing separated major groups (VN types for *C. neoformans* and VG types for *C. gattii*) corresponding to AFLP genotypes described in large series of clinical and environmental isolates, providing tools for global epidemiological studies on cryptococcosis and its agents (3,17,18).

Clinical and environmental isolates present as round or oval encapsulated yeast cells, measuring 5-10 μm in diameter without capsule. They reproduce asexually by budding, but they also can reproduce sexually *in vitro* forming basidia and basidiospores of two *Filobasidiella* species (*F. neoformans* corresponding to *C. neoformans* and *F. bacillispora* corresponding to *C. gattii*) (22, 23, 24, 25). Two mating types are recognized: MAT α strains predominate worldwide in the environment as well as in infected individuals (1,6,9,18) and are significantly more virulent than MAT α strains, as experimentally demonstrated in mice (2, 23, 24, 27).

The involvement of central nervous system (CNS) with meningitis has been traditionally reported in both *C. neoformans* and *C. gattii* infections, with or without clinical or radiological signs of pulmonary lesion. Almost all disseminated forms by *C. neoformans* strains occur in immunocompromised individuals (1), except in a few cases without known predisposing factor, suggesting the existence of some escape mechanisms (5,17). In contrast, cryptococcosis by *C. gattii* almost always affects individuals with no identifiable immune impairment, and commonly presents, beside meningitis, CNS and pulmonary mass lesions (3). Outbreaks of pneumonia and CNS infection caused by *C. gattii* have been described in animals (17, 18, 19) and also in humans. For instance, on Vancouver Island, Canada, *C. gattii* MAT α

molecular/genotype VGII/AFLP6 was identified as agent of pneumonia and meningoencephalitis in humans, cats, dogs and other animals (17, 19, 20).

Cryptococcus strains express a variety of virulence factors involved in the modulation of infection and disease, being remarkable the link between virulence and mating type α (3). The surrounding capsule is a major virulence factor and, together with the ability of melanine production by a laccase, are unique features among human pathogenic fungi. The respiratory tract is the portal of entrance of airborne propagules from the environment and is capital for understanding the pathogenesis of cryptococcal infections. After inhalation of basidiospores or capsule desiccated yeast cells by immunocompetent hosts, the initial infection is supposed to be usually trapped in a lung granuloma that induces an immunomodulatory response (4, 21).

Pulmonary infections, if not restricted by granuloma formation, can disseminate and cause significant disease, attaining mainly the CNS, lungs, skin, and eyes. In fact, every organ can be affected (1).

Several animal models have been used for the study of pathogenesis of cryptococcosis, including mice, guinea pigs, rats and rabbits (1). Most of them used mice infected with *C. neoformans* strains by the intraperitoneal route, considered the most convenient. However, intratracheal or intranasal inoculation may simulate a natural infection (1). The pathogenicity of two *C. gattii* strains has been analysed and compared to reference strains in an immunocompetent mouse model infected by the intraperitoneal route (22).

As the pathogenic mechanisms involved in the early stages of lung infection by *Cryptococcus* species are still poorly known, in the present study we followed separately the process of internalization of *C. neoformans* and *C. gattii* strains in the lung in immunocompetent mice, describing its penetration and comparing possible differences.

MATERIALS AND METHODS

***Cryptococcus* cultures and growth conditions**

Cryptococcus neoformans (isolate LMM 736) serotype A (*MAT* α), VN I/AFLP 1, and *Cryptococcus gattii* (isolate LMM 21) serotype B (*MAT* α), VG II/AFLP 6, characterized as previously described (17), were provided by the Culture Collection of the Mycology Service, Evandro Chagas Clinical Research Institute (IPEC/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil. Stock cultures were maintained at -70 °C, and cultures started by inoculation on Sabouraud dextrose agar (Difco Laboratories, Detroit, Mich.), incubated for 48h at 37 °C. The yeast cells assigned for inoculation were obtained by centrifugation and washing in phosphate buffered saline (PBS). The yeast cell number was estimated by Neubauer chamber counting and confirmed by the CFU number obtained by plating on niger seed agar medium.

Animals

Swiss Webster male mice, 4-6 weeks old, weighing 18-20g, were obtained from the breeding colony of the Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil. Mice were kept into cages with sterilized bedding and supplied with sterilized commercial food pellets and fresh water *ad libitum*.

Infection

All animals were anesthetized by intramuscular injection of a mixture containing 50 μ L ketamine hydrochloride (100 mg) (Park-Davies and Co. Bogotá, Colombia) and xylazine (20 mg) (Bayer S.A., Brasil). When deep anaesthesia become obtained, animals were intratracheally instilled with: a) 10^5 yeast cells of *C. neoformans* in 50 μ L of saline (30 animals); b) 10^5 yeast cells of *C. gattii* in 50 μ L of saline (30 animals); or c) 50 μ L of saline without fungi (10 animals).

After instillation, mice abdomen was compressed and released to cause deep inhalation. Animals were killed at 2, 12, 24, 48 and 72 hours post-instillation (p.i.). At each period, mice were killed by intraperitoneal injection of 1.0 mL of 2.5% sodium penthotal (Abbott Laboratories, Chicago, IL, E.U.A).

Histopathology

For each animal, lungs were recovered, preserved in Carson's Milloning-formalin (28), and embedded in paraffin. Tissue sections (5 μm -thick) were stained with hematoxylin and eosin (H&E), Lennert's Giemsa and Sirius Red (pH=10.2) to determine the type and intensity of the inflammatory response. Silver methenamine (Grocott), Mucicarmin and PAS stain were used to detect fungal structures. All sections were examined by brightfield microscopy (Photomi, Zeiss) and images were acquired with a Hamamatsu C5810 digital camera.

RESULTS

Histopathological findings

In all *C. neoformans* and *C. gattii* yeast-instilled mice there was segmented distribution of fungi with localized reaction in the alveolar and bronchiolar air spaces as well as in tissue parenchyma. Parenchymal yeasts were predominantly extracellular and not associated with tissue necrosis. There were also polymorphonuclear cells (PMNs) accumulations that constituted extensive, ill-defined masses.

***C. neoformans* (Cn) infection:** The groups showed a great number of fungal cells at early periods. At 2 hours p.i. these cells exhibited similar shape and size to those maintained *in vitro* as used for inoculation. At this time, *Cn* cells were located in the lumen of respiratory tree, including the upper nasal level, larynx, trachea, bronchi and bronchioles, randomly distributed in single or clusters of yeast cells. Some of them, especially those adhered to the bronchial epithelium, exhibited already a capsule expansion (Fig. 2) and others passed through the bronchial epithelial cells, causing local damage and allowing some fungi to reach the peribronchial tissue (Fig. 4). At these periods there was observed variation in the size of *Cn* cells, with emergence of small budding forms, indicative of extracellular replication *in vivo* (Figs 2, 4).

At 12 hours p.i. most *Cn* cells showed larger encapsulated forms, attached to the bronchial epithelium or to alveolar spaces. Compact clusters of *Cn* cells were also observed inside the bronchial lumen, blocking totally or partially the air pathway (Fig. 6). In some lung areas the *Cn* cells showed radial projections inside the capsule (Fig. 8). At this time more small buds appeared within intense inflammatory reactions, with lymphocytes, neutrophils, monocytes and plasma cells (Fig. 8).

At 24 hours p.i. the number of *Cn* cells still increased by intense budding, accompanied by intense inflammatory reactions, similar but more intense than that observed at 12h. There were also bronchial and peri-bronchial *Cn* cells inside an intense neutrophilic infiltrate, characterizing a suppurative pneumonia (Figs. 10, 12).

At 48 hours p.i. it was observed a decrease in the number of *Cn* cells, as well as progressive decrease in inflammation extension (Fig. 14), and many macrophages looked foamy, few of them containing fungal elements (Fig. 16). Yeast cells were also visualized inside the bronchium, bronchial artery, and peri-bronchial area, suggesting penetration through lymphatic vessels. Some macrophages seemed to be unable to reach the fungal cells to phagocyte them (Figs. 14, 16).

At 72 h p.i. the same airway obstruction and periarterial distribution (perilymphatics) were observed (Figs. 18, 20). Figures 22 and 22 show *Cn* cells interacting with bronchial epithelium, much bigger size than macrophages.

***Cryptococcus gattii* (Cg) infection:** At 2 hours p.i. *Cg* cells were present at bronchi, bronchioles and alveoli. Small fungal cells were observed entering some alveoli or attached to bronchial epithelium wall, without major shape changes (Fig. 1). At this moment, inflammatory infiltrate was not observed, despite the presence of some neutrophils and mature monocytes. Some *Cg* cells interact with the bronchial wall, sometimes being internalized by the epithelium layer (Fig. 3).

At 12 hours p.i. several *Cg* cells present capsule and start to bud (Fig. 5). Encapsulated yeast cells showed preferential adhesion to pneumocytes. Inflammatory pattern was mild like in 2 h p.i. animals (Fig. 7).

After 24 hours p.i. the infection pattern continued to be focal, even though at this time there was observed a great number of encapsulated *Cg* cells inside a bigger inflammatory infiltrate. Focal infections, with alveolar atelectasia, were also detected. Fungal cells grown adhered to the bronchi forming masses composed by *Cg* cells, mucous and detached epithelial cells, characterizing bronchial epithelium damage (Figs. 9, 11).

At 48 hours p.i., capsule expansion caused bronchial atelectasia. Single encapsulated *Cg* cells were observed without peri-inflammatory infiltrate in the alveoli. A similar mass formation inside the bronchi as it was seen at 24h p.i., was observed (Fig. 13). These capsulated cells seemed to be internalized through the bronchial epithelial cells (Fig. 15).

At 72 hours p.i., the fungi became larger, with a huge capsule, which had some staining differences, i.e., some were negative to Sirius Red and some others were positive. The attachment to bronchial epithelia persists as well as the mass formation together with mucous inside the bronchi (Fig. 17). Many *Cg* cells were observed around bronchial arteries, at lymphatic territories (Fig. 19). Foamy hyperplastic macrophages were seen, some of them containing fungal particles (Figs. 21, 23). Bronchial epithelia were also hyperplastic and contained huge amount of PAS-positive material. Some yeast cells were seen inside blood vessels circulating with blood.

Saline-treated animals (“sham group”) had no histopathological modifications.

DISCUSSION

Here, a mice model was used to sequentially analyze the intrapulmonary changes in the early stages of cryptococcal infection, after intratracheal instillation, of pathogenic strains of *C. neoformans* and *C. gattii*, isolated from HIV patients in Rio de Janeiro, Brazil. The main sequential histopathological changes from 2 up to 72h of infection were presented. The intratracheal instillation of both strains resulted in a rapid deposition of yeasts in alveolar sacs, detected already at 2 hours pi.

Comparison between *Cn* and *Cg* infected mice revealed important peculiarities. One of the major differences was the earlier expression of the polysaccharide capsule by *Cn* in comparison to *Cg*. Because of its earlier polysaccharide capsule expression, *Cn* is larger in size, what can contribute for its escape from the host defense mechanisms and longer persistence in the respiratory tract. This escape mechanism and the consequent difficulty to diffusion result in a large local inflammatory reaction and early budding.

In contrast, *Cg* was observed in smaller yeast forms in the pulmonary parenchyma, causing a weak inflammatory reaction, which also favors the fungus escape, allowing its early diffusion. The capsular polysaccharide glucuronoxylomannan (GXM) of *C. neoformans* has been shown to interfere with neutrophils migration and the 6-O-acetylated mannose of GXM is a crucial motive for the inhibition of neutrophils

recruitment (29). This effect is due to interference of GXM both in neutrophils and endothelial cells (30).

Both species adhered to the apical surface of bronchial and bronchiolar epithelium. Such results suggest the existence of fungal tropism toward the respiratory epithelium. This could be mediated by unknown specific molecules (ligands/ receptors). Otherwise, Cg cells showed more frequent adherence to pneumocytes. In fact, secreted *C. neoformans* phospholipase B (PLB1) was demonstrated to play a role in the binding of the fungi to host epithelial cells *in vitro* (A549 epithelial cell line), possibly due to production of fatty acids from plasma membranes and/or surfactant by PLB activity (31). There were no studies showing the differential expression of PBL1 in each strain.

Our findings point to two different ways of *Cryptococcus* dissemination: 1) through penetration in alveolar capillaries and 2) through invasion of juxta-bronchial arteries and/or lymphatics. In the former situation, the fungi can depart from alveolar sacs, and by transposition through the pneumocytes barrier they can reach the alveolar septa and capillaries. In the second one, they can get away from the bronchiolar lumen, transpass the epithelium and the peribronchial and periarial or perilymphatic connective tissue, invading the vessel wall. They can also exit from alveolar sacs adjacent to the vessels. Extracellular proteinase activity was studied for eight strains of *C. neoformans var. neoformans* and two strains of *C. neoformans var. gatti*. All studied strains produced extracellular proteolytic activity (32). *C. neoformans* can produce aspartyl and serine proteases and metalloprotease with similarity to an alastinolytic metalloprotease of *Aspergillus fumigatus* (33, 34, 35).

Previous studies conducted with experimental models of silicosis and pulmonary paracoccidioidimycosis reported that histiocytes capture the fungi particles and then disseminate them through the hematogenic way (36). In our study, however, macrophages with phagocytic bodies containing fungi were very uncommon. The observation of giant cells was also very rare. The budding of *Cn* and *Cg* yeasts occurred independently from macrophage phagocytosis, which was verified *in vitro* by Feldmesser et al. (39).

Both *Cn* and *Cg* expressed a very large polysaccharide capsule after they adhere to the respiratory epithelium. This reinforces that the presence of capsule inside the lungs may contribute to the successful establishment of lung infection, and that the capsule size may, in addition to inhibiting phagocytosis, play a significant role in destroying the epithelium, enhancing the penetration into the host. Cryptococcal polysaccharide is necessary for fungal survival *in vivo*. Release of this capsular component has been previously associated to host damage and disease (3). Recent studies suggest a new mechanism through which polysaccharide packaged in lipid vesicles crosses the cell wall and the capsule network to reach the extracellular environment (40).

We do not know the molecular meaning of the morphological changes (color and shape) observed in the polysaccharide capsule during different moments of the infection. Inside the capsule, radial projections appeared with distinct shades of red with Sirius Red staining, as well as distinct forms of the fungus structure were also detected, suggesting some dynamic aspects of the fungal secretion as was described by Rodrigues et al. (41).

The strain *Cn* produces disease predominantly in immune-affected hosts and *Cg* in immune-competent ones (1, 30, 31), resulting in distinct clinical entities, suggesting the occurrence of different pathogenesis. The mechanisms used by each strain in natural disease are difficult to compare *in vivo* due the marked differences in immune status of the affected hosts. Thus, immune-competent animals were here applied to compare different histopathological responses between the strains. The immune-competent mice allowed evidencing a more conspicuous local inflammatory reactions and obstruction capacity of *Cn* cells in the respiratory airways and alveoli, compared to a less inflammatory host response provoked by *Cg* cells. However, this strain presented a higher invasive capacity of the bronchiolar and alveolar walls, followed by more intense vascular access of the fungi to the circulation. The difference in the characteristics of the capsule between the strains can be an important differential factor related to the pathogenesis. Indeed, the capsule of the *C. neoformans* is considered to be a virulence factor because of its antiphagocytic properties and acapsular fungi adhered significantly more to endothelial cells and caused greater endothelial cell injury than did encapsulated organisms (42).

The *Cn* strain used in our animal model was serotype A, corresponding to the most common molecular type (genotype VNI/AFLPI) associated to AIDS in the world. The *Cg* strain used was a molecular (genotype VGII/AFLP 6), the most common in Latin America, endemic in the northern north east regions of Brazil, related also to outbreaks in Spain and Vancouver, considered a virulent type. Differences in the virulence between these strains is requiring further studies in experimental models (17, 19, 20).

CONCLUSION

In conclusion, our studies on the early stages of acute cryptococcal infection using a mice model revealed different histopathological responses in the lungs produced by *C. neoformans* or *C. gattii*. Pulmonary invasion and dissemination mechanism of *Cryptococcus* at the respiratory tract level and early stage of the experimental infection does not depend directly on the participation of neutrophils and mononuclear cells. That process takes place, in part, through the physical interaction between the fungi and the respiratory epithelium, being the intrinsic mechanisms yet unknown.

These data suggest that adhesion of both *C. gattii* and *C. neoformans* strains, followed by internalization, can potentially determine the lesion and lung dissemination mechanisms. The high inoculum seems to be critical for the immunocompetent mice infection model here analysed, and it may shed light to early events and pathogenesis of disseminated cryptococcosis by *C. gattii* in normal hosts recently described in human and animal outbreaks (17, 20).

Authors' contributions: MGFL and MPM designed the study project; MSL and BW Isolation, identification, serotyping and donation of the cells of yeasts (*C. neoformans* and *C.gattii*) and preparation of the inoculation; MGFL execution of the experiment; MGFL HLL and MPM carried out evaluation and image acquisition; MGFL and MPM carried out histopathological analysis; MGFL, MPM, MSL and BW carried out the case acquisition, bibliographic review; MGFL, MPM and HLL discussed the interpretation of the results, and revision and selection of images and drafted the manuscript. MGFL, MPM, MSL, BW and HLL discussed the interpretation of the results. All authors read and approved the final manuscript. MGFL, MPM, MSL, BW and HLL are guarantors of the paper.

Funding: CNPq/PQI/CAPES/ UEPA-PA/FIOCRUZ-RJ.

Conflicts of interest: None declared.

Acknowledgements: The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health (PDTIS, Fiocruz), Luzia Caputo and Marcela Blança for the technical assistance in histotechnology.

REFERENCES

- 1 Casadevall A, Perfect JR. Animal models and Veterinary aspects of Cryptococcosis. In: *Cryptococcus neoformans*. American Society for Microbiology, Washington, 1998. 325-350.
- 2 Casadevall A, Pirofski LA. Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalisms, colonization, infection, and disease. *Infect. Immun.* 2000. 68: 6511-6518.
- 3 Steenbergen JN, Casadevall A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microb and Infec.* 2003. 5: 667-675.
- 4 Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, Scorzetti G, Statzell-Tallman A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2000. 50: 1351-1371.
- 5 Kawakami K, Zhang T, Qureshi MH, and Saito A. *Cryptococcus neoformans* Inhibits Nitric Oxide Production by Murine Peritoneal Macrophages Stimulated with Interferon- γ and Lipopolysaccharide. *Cell. Immun.* 1997.180: 47-54.
- 6 Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Theodore TS. *Cryptococcus bacillisporus* sp.nov.: serotype B-C of *Cryptococcus neoformans*. *Int J Syst Bact.* 1978. 28: 616-620.
- 7 Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Epidemiologic differences between two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am. J. Epidemiol.* 1984.120:123-130.
- 8 Kwon-Chung K, Gene disruption to evaluate the role of fungal candidate virulence genes. *Curr. Opin. Microbiol.* 1998. 1: 381-389.
- 9 Nielsen K, Cox GM, Wang P, Toffaletti DL, Perfect JR, and Heitman J. Sexual cycle of *Cryptococcus neoformans* var *grubii* and virulence of congenic α and α isolates. *Infect and Immun.* 2003.71: 4831-4841.
- 10 Pirofski LA, Casadevall A. The meaning of microbial exposure, infection, colonisation, and disease in clinical practice. *Lancet Infect. Dis.* 2002 2: 628-635.
- 11 Hoang LMN, Maguire JA, Doyle P, Fyfe M, and Roscoe DL. *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver Hospital and Health Sciences Centre (1997-2002): epidemiology, microbiology and histopathology. *J. Med. Microbiol.* 2004. 53: 935-940.
- 12 Correa MPS, Duarte RR, Parda PP, Oliveira FM, and Severo LC. Criptococose em crianças no Estado do Pará. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1999.32: 505-508
- 13 Grosse P, Tintelnot K, Söllner O and Schmitz B. Encephalomyelitis due to *Cryptococcus neoformans* var *gattii* presenting as spinal tumor: case report and review of the literature. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2001. 70: 113-116.

- 14 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: 804-806.
- 15 Trilles L, Lazéra MS, Wanke B, Theelen B, Boekhout T. Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. *Med. Mycol.* 2003. 41: 383-390.
- 16 Kwon-Chung K, Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res.* 2006. 6: 574-587.
- 17 Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:17258–63.
- 18 Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var *grubii*: separate varieties status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *J. Microbiol.* 1999. 37: 838-840.
- 19 Baró T, Tores JM, Hermoso de Mendoza M. First identification of autochthonous *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* isolated from goats with predominantly severe pulmonary disease in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36: 458 - 461.
- 20 Raso TF, Werther K, Miranda T, Mendes-Giannini MJS. Cryptococcosis outbreak in psittacine birds in Brazil. *Med Mycol.* 2004. 42: 355-362.
- 21 Franzot SP, Fries BC, Cleare W, Casadevall A. Genetic relationship between *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* strains of serotype A and D. *J. Clin. Microbiol.* 1999. 67: 2218-2224.
- 22 Torres-Rodríguez JM, Morera Y, Baró T, Corominas JM, Castañeda E. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in an immunocompetent mouse model. *Med Mycol.* 2003. 42: 355-362.
23. Boekhout T, Van Belkum A, Leenders AC, *et al.* Molecular typing of *Cryptococcus neoformans*: taxonomic and epidemiological aspects. *Int J Syst Bacteriol.* 1997. 47: 432-442.
- 24 Naka W, Masuda M, Konohana A, Shinoda T and Nishikawa T. Primary cutaneous cryptococcosis and *Cryptococcus neoformans* serotype D *Clin. Exp. Dermatol.* 1995. 20: 221-225.b
- 25 Kwon-Chung KJ, Polacheck I, and Bennett JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotype B and C). *J. Clin. Microbiol.* 1982.15:535-537.
- 26 Lazéra MS, Wanke B, and Nishikawa MN. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J. Med. Vet. Mycol.* 1993. 31:449-454.

- 27 Chaturvedi S, Rodeghier D, Fran J, McVlelland CN, Wickes BI, Chaturvedi V. Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* Mat α and Mat \mathbf{a} pheromones to determine mating type ploidy and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies. *J. Clin. Microbiol.* 2000. 38:2007-2009.
- 28 Carson FL, Martin JH, and Lynn JA. Formalin Fixation for Electron Microscopy. - *Am. J. Clin. Pathol.* 1973. 59:365-373.
- 29 Ellerbroek PM, Lefeber DJ, van Veghel R, Scharringa J, Brouwer E, Gerwig GJ, Janbon G, Hoepelman AI, Coenjaerts FE. O-acetylation of cryptococcal capsular glucuronoxylomannan is essential for interference with neutrophil migration. *J Immunol.* 2004.173:7513-20.
- 30 Ellerbroek PM, Hoepelman AI, Wolbers F, Zwaginga JJ, Coenjaerts FE. Cryptococcal glucuronoxylomannan inhibits adhesion of neutrophils to stimulated endothelium in vitro by affecting both neutrophils and endothelial cells. *Infect Immun.* 2002.70:4762-71.
- 31 Ganendren R, Carter E, Sorrell T, Widmer F, Wright L. Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. *Microbes Infect.* 2006.8:1006-15.
- 32 Chen LC, Blank ES, Casadevall A. Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1996.3:570-4.
- 33 Yoo Ji J, Lee YS, Song CY, Kim BS. Purification and characterization of a 43 - kilodalton extracellular serine proteinase from *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol.* 2004.42:722-6.
- 34 Eigenheer RA, Jin Lee Y, Blumwald E, Phinney BS, Gelli A. Extracellular glycosylphosphatidylinositol-anchored mannoproteins and proteases of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res.* 2007.7:499-510.
- 35 Pinti M, Orsi CF, Gibellini L, Esposito R, Cossarizza A, Blasi E, Peppoloni S, Mussini C. Identification and characterization of an aspartyl protease from *Cryptococcus neoformans*. *FEBS Lett.* 2007.581:3882-6.
- 36 Gonzalez A, Lenzi HL, Mota EM, Caputo L, Sahaza JH, Cock AM, Ruiz AC, Restrepo A, Cano LE. Expression of adhesion molecules in lungs of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Microbes and Infection.* 2005. 7: 666 – 673.
- 37 Banerjee U, Data K, and Casadevall A. Serotype distribution of *Cryptococcus neoformans* in patients in tertiary center in India. *Med. Mycol.* 2004. 42: 181 – 186.
- 38 Rozenbaum R, Gonçalves AJ, Wanke B, and Viera W. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in a Brazilian AIDS patient. *Mycopathologia.* 1990. 112: 33-34.

39 Feldmesser M, Kress Y, Novikoff P, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infection and Immunity*.2000. 68 (7): 4225-4237.

40 Rodrigues ML, Nimrichter L, Oliveira DL, Frases S, Miranda K, Zaragoza O, Alvarez M, Feldmesse M, Casadevall A. Vesicular polyssacharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryotic cell*. 2007. 6: 48-59.

41 Rodrigues ML, Nakayasu ES, Oliveira DL, Nimrichter L, Nosanchuk JD, Almeida IC, Casadevall A. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot Cell*. 2008.7:58-67.

42 Ibrahim AS, Filler SG, Alcouloumre MS, Kozel TR, Edwards JE Jr, Ghannoum MA. Adherence to and damage of endothelial cells by *Cryptococcus neoformans* in vitro: role of the capsule. *Infect Immun* 1995. 63: 4368-4374.

LEGENDS

FIGURE 1 – Histological description of lungs in mice intratracheally instilled with 10^5 yeast cells *C. gattii* were present at bronchi, bronchioles and alveoli or attached to bronchial epithelium wall, without changes, 2h p.i. (stained with Giemsa).

FIGURE 2 – Histological description of lungs in mice intratracheally instilled with 10^5 yeast cells *C. neoformans* were located in lumen of respiratory tree and adhered to the bronchial epithelium, exhibited already a capsule expansion, 2h p.i. (stained with Giemsa).

FIGURE 3 – Show *C. gattii* cells interact with the bronchial wall, sometimes being internalized by the epithelium layer, 2h p.i. (stained with Sirius red).

FIGURE 4 - Show variation in the size of *C. neoformans* cells, with emergence of small budding forms, indicative de extra cellular replication *in vivo*, was observed others passed thought the bronchial epithelial cells, causing local damage, 2h p.i. (stained with Grocott).

FIGURE 5 – Show several *C. gattii* cells present capsule and start to bud, 12h p.i. (stained with Sirius red).

FIGURE 6 – *C. neoformans* cells showed larger encapsulated forms, attached to the epithelium or to alveolar spaces. Compact clusters of *C. neoformans* cells were also observed inside the bronchial lumen, blocking totally or partially the air pathway, 12h p.i. (stained with Giemsa).

FIGURE 7 – Encapsulated yeast cells showed preferential adhesion to pneumocytes, 12h p.i. (stained with Sirius red).

FIGURE 8 – Show more small buds appeared within intense inflammatory reactions, with lymphocytes, neutrophils, monocytes and plama cells, 12h p.i. (stained with Giemsa).

FIGURE 9 – Show a great number of encapsulated *C. gattii* cells inside a bigger inflammatory infiltrate. Focal infections, with alveolar atelectasia, 24h p.i. (stained with Sirius red).

FIGURE 10 – Show the number of *C. neoformans* cells still increased intense budding, accompanied by intense inflammatory reactions more intense than the observed at 12h. As well as also bronchial and peri-bronchial *C. neoformans* cells inside an intense neutrophilic infiltrate, characterizing a suppurative pneumonia, 24h p.i. (stained with Giemsa).

FIGURE 11 – Fungal cells grow adhered to the bronchi forming masses composed by *C. gattii* cells, mucous and detached epithelial cells, characterizing bronchial epithelium damage, 24h p.i. (stained with Giemsa).

FIGURE 12 – Show *C. neoformans* cells inside an intense neutrophilic infiltrate, several cells present capsule and start to bud, 24h p.i. (stained with Giemsa).

FIGURE 13 – Show at 48h p.i., a similar mass formation inside the bronchi it was seen at 24h p.i. (stained with Sirius red).

FIGURE 14 – Show a decrease in the number of *C. neoformans* cells, as well as progressive decrease in inflammatory extension and also visualized inside the bronchium, bronchial artery, and peri-bronchial area, suggesting penetration through lymphatic vessels, 48h p.i. (stained with Sirius red).

FIGURE 15 – Show capsulated cells seemed to be internalized trough the bronchial epithelium cells, 48h p.i. (stained with Sirius red).

FIGURE 16 – Show a progressive decrease in inflammatory extension and many, macrophages looked foamy, few of them containing fungal elements, 48h p.i. (stained with Sirius red).

FIGURE 17 – Show the attachment to bronchial epithelia persists as well as the mass formation together with mucous inside the bronchi, 72h p.i. (stained with Sirius red).

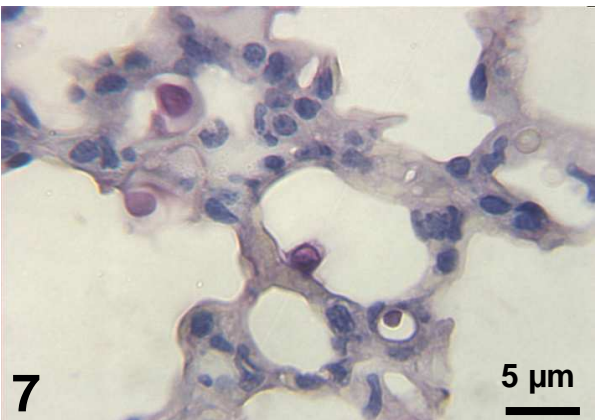
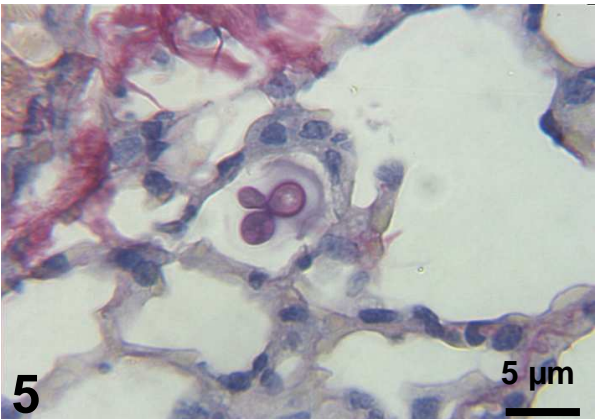
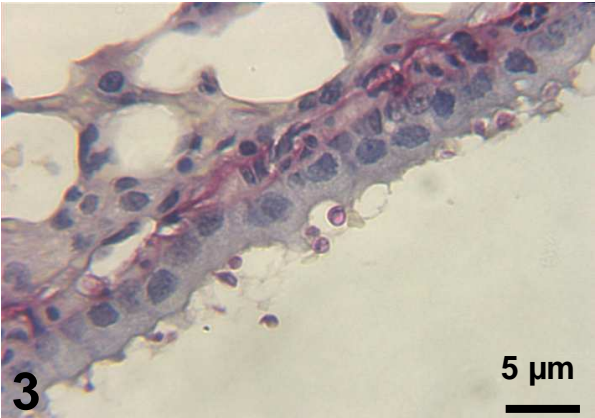
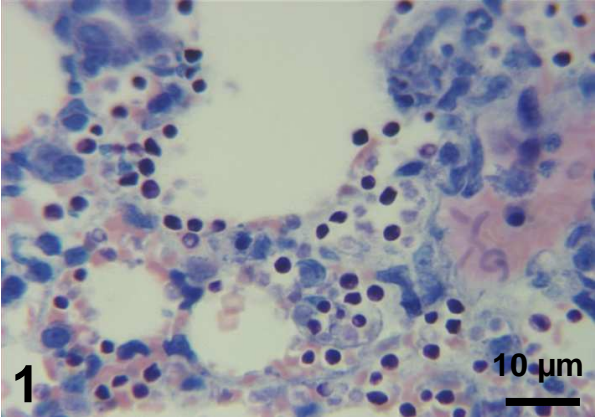
FIGURE 18/20 – Show the same airway obstruction and periarterial distribution (perilymphatics), 72h p.i. (stained with Sirius red).

FIGURE 19 – Show Many *C. gattii* cells around bronchial arteries, at lymphatic territories, 72h p.i. (stained with Sirius red).

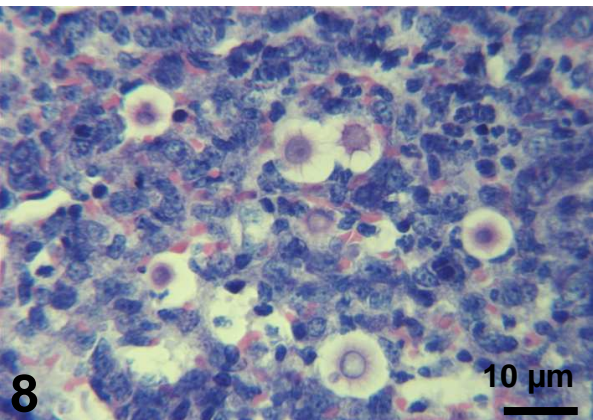
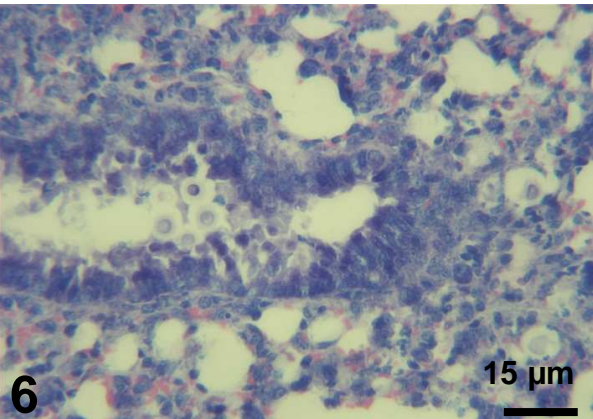
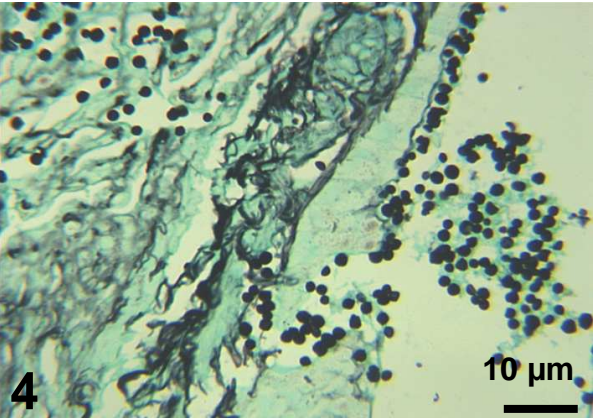
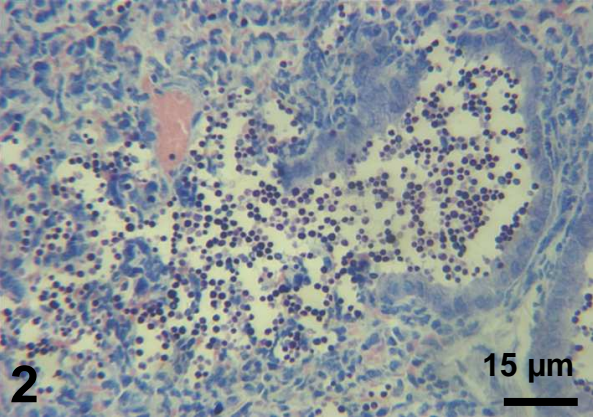
FIGURE 21/23 – Show foamy hyperplastic macrophages, some of them is containing fungal particles, 72h p.i. (stained with Sirius red).

FIGURA 22/24 - Show *C. neoformans* cells interacting with bronchial epithelium, much bigger size than macrophages, 72h p.i. (stained with Sirius red).

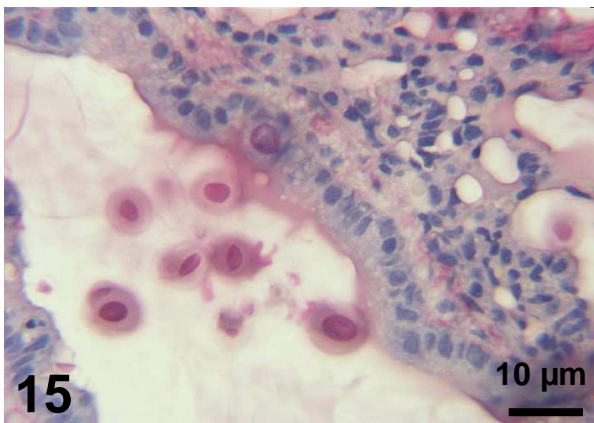
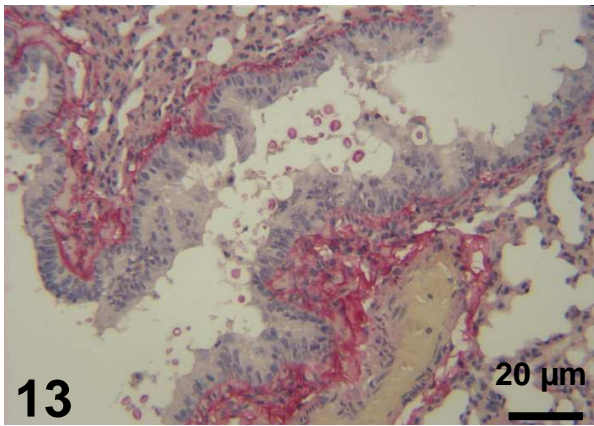
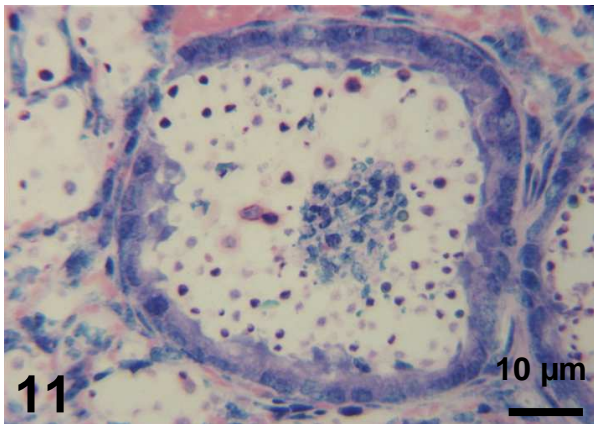
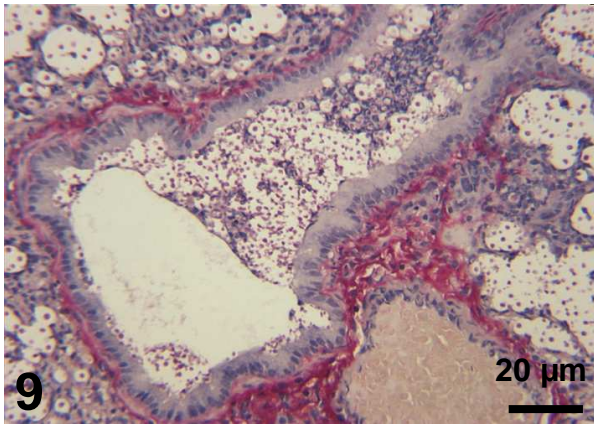
Cryptococcus gattii



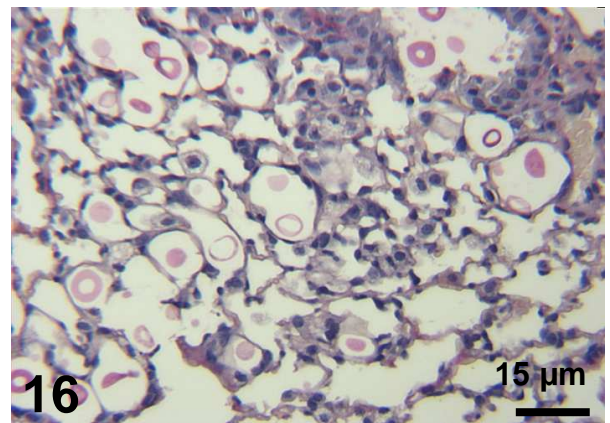
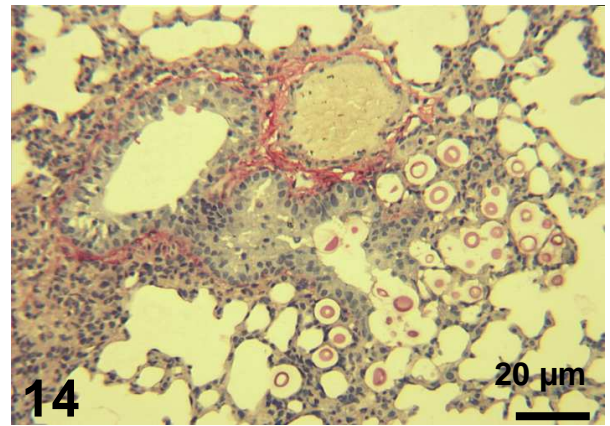
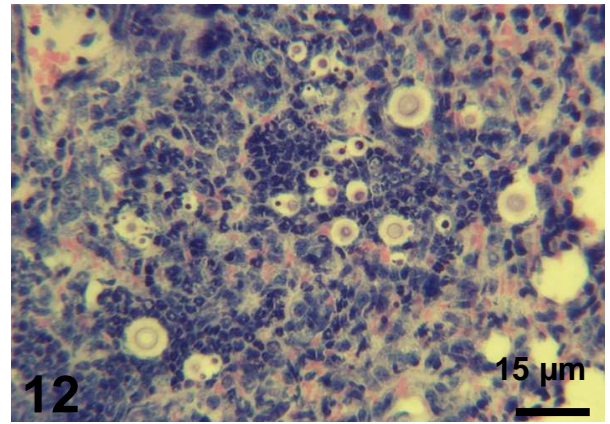
Cryptococcus neoformans



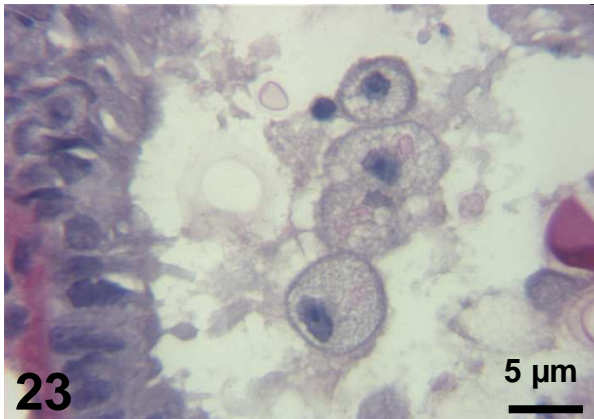
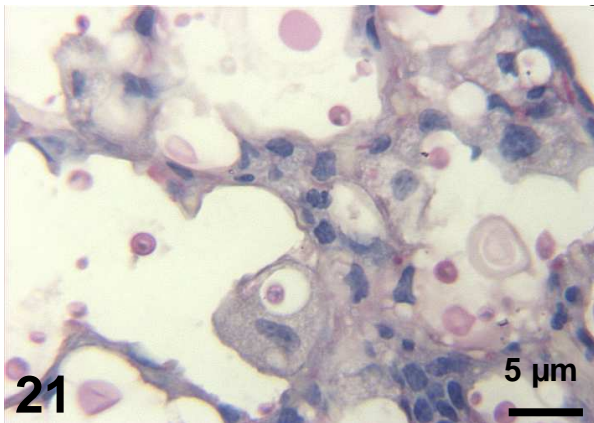
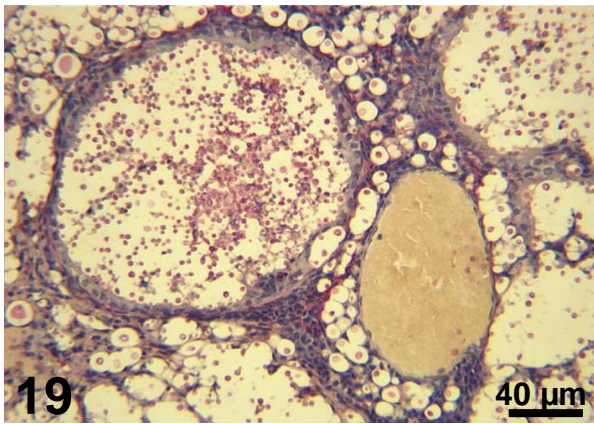
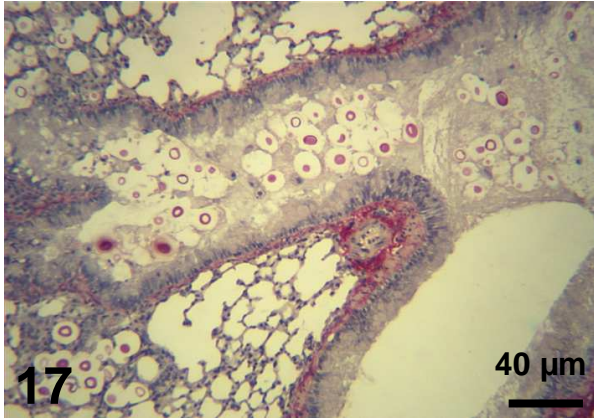
Cryptococcus gattii



Cryptococcus neoformans



Cryptococcus gattii



Cryptococcus neoformans

