

LÊDA MARIA RABELO

**ESTUDOS MORFOMÉTRICOS DA CÁPSULA DO
CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS E SUA RELAÇÃO COM O
NÚMERO DE LINFÓCITOS CD4**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Flávio de Queiroz Telles F^o.

Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Monteiro de Almeida.

Curitiba

1999



Ministério da Educação e do Desporto
Universidade Federal do Paraná
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA INTERNA
=MESTRADO=

PARECER

Parecer Conjunto dos Professores Dr. Flávio de Queiroz Telles Filho, Dr. Arnaldo Lopes Colombo e Dr. Gilberto Minguetti sobre a Dissertação de Mestrado em Medicina Interna da Universidade Federal do Paraná, elaborada pela Dr.^a Leda Maria Rabelo, intitulada “ESTUDOS MORFOMÉTRICOS DA CÁPSULA DO CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS E SUA RELAÇÃO COM O NÚMERO DE LINFÓCITOS CD4”.

A Banca Examinadora considerou que a Dr.^a **Leda Maria Rabelo**, apresentou trabalho adequado para Dissertação de Mestrado e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, atribuindo-lhe **Conceito “ A ”**, correspondente ao **Grau “ 10 ”** sendo pois unanimemente recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **Mestre em Medicina Interna** e a publicação da Dissertação em veículo de divulgação conveniente, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições.

Curitiba, 21 de maio de 1999.


Prof. Dr. Flávio de Queiroz Telles Filho


Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo


Prof. Dr. Gilberto Minguetti

LÊDA MARIA RABELO

ESTUDOS MORFOMÉTRICOS DA CÁPSULA DO
CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS E SUA RELAÇÃO COM O
NÚMERO DE LINFÓCITOS CD4.

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre do Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientador: Prof. Dr. Flávio de Queiroz Telles F^o
Setor de Ciências da Saúde, UFPR

Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo
Chefe do Laboratório Especial de Micologia, UFSP

Prof. Dr. Gilberto Minguetti
Setor de Neurologia, UFPR

Curitiba, 21 de maio de 1999

Dedico este trabalho ao grande amor da minha vida, Paulo;
Ao nosso filho Gabriel, que nasce daqui a alguns dias;
A minha mãe, retrato da mulher forte e perseverante;
Ao meu pai, já falecido, exemplo de luta pela vida;
A Deus, fonte de toda minha energia.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Flávio de Queiroz Telles Filho, orientador, portador do verdadeiro espírito de pesquisador;

Ao Dr. Sérgio Monteiro de Almeida, co-orientador, amigo prestativo, pessoa de alto valor didático, exemplo de interesse pela pesquisa;

Aos amigos e colaboradores da Seção de Micologia do Serviço de Análise Clínicas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná:

Bióloga Rosângela Lameira Pinheiro,
Biólogo Carlos Henry Bellot Vargas,
Bioquímica Gisele Pesquero F. Bordignon,
Bioquímica Marisol Domingues Muro,
Bioquímica Nanci Tomaz Roque,
Técnica Emília Marico Giussani,
Técnica Maria Francisca Dias,
Técnica Adriana de Fátima Gabriel;

Aos funcionários do Setor de Imunofenotipagem da Seção de Imunogenética do Serviço de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, em especial à Dra Mariester Malvezzi;

Aos funcionários do Setor de Sorologia do Serviço de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, em especial à bioquímica Elvira Missako Doi;

Aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Evangélico de Curitiba;

Aos funcionários do Hospital Oswaldo Cruz, em especial à diretora clínica Dra. Mírian Tomoko Matsuno Carvalho;

À Dra. Maria Cristina Assef, médica infectologista do corpo clínico do Hospital do Trabalhador (antigo Hospital Geral do Portão);

Às professoras Edith Fanta e Sônia Grotzner do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná;

Ao professor Juarez Gabardo, chefe do Departamento de Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela análise estatística, boa vontade e simpatia que lhe são características;

Ao professor Dr. Lineu Cesar Werneck, coordenador do Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna - Nível Mestrado, por sua dedicação e espírito científico;

Ao professor Dr. Arnaldo Lopes Colombo, chefe do Laboratório Especial de Micologia da Universidade Federal de São Paulo onde foi realizada dosagem de antigenemia de cinco dos 30 pacientes.

SUMÁRIO

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES E ABREVIATURAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	6
3 REVISÃO DE LITERATURA	7
3.1 Histórico	7
3.2 Definição	9
3.3 Agente Etiológico	9
3.4 Variedade <i>neoformans</i>	11
3.5 Variedade <i>gattii</i>	12
3.6 Rota da Infecção	14
3.7 Manifestações Clínicas	14
3.7.1 Pacientes sem AIDS	14
3.7.2 Pacientes com AIDS	15
3.8 Diagnóstico	16
3.9 Tratamento	17
3.10 Fatores Prognósticos	18
3.10.1 Pacientes sem AIDS	19
3.10.2 Pacientes com AIDS	19
3.11 A criptococose no Paraná	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Casuística	21
4.2 Métodos	21
4.2.1 Confirmação Diagnóstica	21
4.2.2 Análise das Dimensões da Cápsula do <i>Cryptococcus neoformans</i>	23
4.2.3 Análise do CD4	25
4.2.4 Análise Estatística dos Dados	25
5 RESULTADOS	26
5.1 Características Epidemiológicas	26
5.2 Características Clínicas	26
5.3 Características Laboratoriais	27
5.3.1 Achados micológicos	27
5.3.2 Achados sorológicos	29
5.3.3 Achados líquóricos	29
5.4 Características Morfométricas da Cápsula e Linfócitos CD4	29
6 DISCUSSÃO	31
7 CONCLUSÕES	38
ANEXO 1 - Protocolo de criptococose	39
ANEXO 2 - Características epidemiológicas da amostra estudada	40
ANEXO 3 - Provas bioquímicas e meios seletivos usados	41
ANEXO 4 - Características clínicas e laboratoriais da amostra estudada	42
ANEXO 5 - Características líquóricas das amostras estudadas	43
ANEXO 6 - Distribuição de casos de AIDS no estado do Paraná	44
ANEXO 7 - Total de casos de AIDS com criptococose extra pulmonar associada	45
ANEXO 8 - Imagem do <i>Cryptococcus neoformans</i>	46
ANEXO 9 - Relação entre a morfometria e os níveis de CD4	47
ANEXO 10 - Autorização pela Comissão de Ética	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES E ABREVIATURAS

TABELAS

	Pág.
1 Tabela 1 – Características epidemiológicas de 30 pacientes estudados.	26
2 Tabela 2 – Características clínicas da amostra estudada.	27
3 Tabela 3 – Provas bioquímicas e meios seletivos usados na identificação do <i>Cryptococcus neoformans</i> e de suas variedades, realizadas em 30 amostras de LCR.	28
4 Tabela 4 – Características sorológicas de 30 pacientes com neurocriptococose.	29
5 Tabela 5 – Características líquóricas de 30 pacientes com neurocriptococose.	29
6 Tabela 6 – Análise do número de linfócitos CD4, características morfométricas da cápsula e tempo de evolução em pacientes com CD4 menor que 200cel/mm ³ .	30
7 Tabela 7 – Análise do número de linfócitos CD4, características morfométricas da cápsula e tempo de evolução em pacientes com CD4 maior que 200cel/mm ³ .	30

ABREVIATURAS

AIDS	- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
Células NK	- Células <i>Natural Killer</i>
CGB	- Cavalanina Glicina Bromotimol
CNS	- Central Nervous System
CRL	- Cephalorachidian Liquid
GXM	- Glucoronoxilomana
HC	- Hospital de Clínicas
HEC	- Hospital Evangélico de Curitiba
HIV	- Vírus da Imunodeficiência Humana
HOC	- Hospital Oswaldo Cruz
LCR	- Líquido Cefalorraquidiano
LES	- Lúpus Eritematoso Sistêmico
ml	- mililitro
RPM.	- Rotações por minuto.
SNC	- Sistema Nervoso Central
SUS	- Sistema Único de Saúde
TNF-a	- Fator de Necrose Tumoral a
UFPR	- Universidade Federal do Paraná.
Var.	- variedade

RESUMO

A criptococose é uma doença causada pelo fungo encapsulado *Cryptococcus neoformans*, que tem tropismo pelo SNC, sendo a principal forma clínica de apresentação da doença meningite. A deficiência na imunidade celular do hospedeiro é o maior fator de risco para doença. A alta incidência em pacientes com AIDS fez com que o interesse por esta micose profunda crescesse nestas últimas duas décadas. No estado do Paraná, o número de casos de criptococose associados à AIDS vem diminuindo nos últimos dois anos (36 casos em 1997 e 24 em 1998), o mesmo acontecendo no restante do país. A cápsula do *Cryptococcus neoformans* é formada, na sua maior porção, pelo mucopolissacarídeo GXM, que representa a fração mais importante do fungo no que se refere à imunidade, representando também o seu maior fator de virulência. O antígeno capsular GXM exerce uma correlação íntima com o sistema imunológico do hospedeiro. Vários estudos mostram muitos aspectos desta correlação. O presente trabalho estuda a relação entre a morfometria da cápsula do *Cryptococcus neoformans* e o número de linfócitos CD4 do hospedeiro e as características epidemiológicas dos pacientes. As medidas da morfometria da cápsula do *Cryptococcus neoformans* foram realizadas em LCR de 30 pacientes (23 homens e 7 mulheres), com idade média de 33,4 anos para os homens e 37 para as mulheres, todos com diagnóstico de meningite criptocócica, dos quais 25 leveduras e suas respectivas cápsulas foram mensuradas assim como o cálculo do diâmetro, superfície e volume das cápsulas, e também a relação diâmetro cápsula/levedura. Uma média das medidas realizadas nas 25 células foi relacionada com o número de linfócitos CD4 do paciente em estudo. O resultado da investigação mostrou que, dos 30 pacientes, 28 eram imunodeprimidos (93,3%), 26 dos quais com AIDS e dois com outro fator de imunodepressão, dois (6,6%) eram imunocompetentes. A antigenemia no LCR e no soro, para *Cryptococcus neoformans*, foi elevada (1:10.000 $p < 0,0001$) na maioria dos pacientes, sugerindo a gravidade da doença. A medicação usada no tratamento foi a monoterapia com anfotericina B em 22 (73,4%) pacientes. O óbito, tendo como causa a meningite criptocócica, ocorreu em 16 (53,3%) dos pacientes e, destes, 9 (56,2%) ocorreram nas primeiras duas semanas de tratamento. A var. *neoformans* foi prevalente em nossa casuística (29 dos 30 pacientes). Não houve significância estatística entre o número de linfócitos CD4 e a morfometria da cápsula do *Cryptococcus neoformans* e, no aspecto epidemiológico da criptococose, observamos uma queda em sua incidência nos pacientes com AIDS nos últimos dois anos, coincidindo com a instituição da poliquimioterapia antiretroviral nestes pacientes.

ABSTRACT

Cryptococcosis is an illness caused by the encapsulated fungus *Cryptococcus neoformans*, which has tropism by the CNS, being meningitis the main clinical form of presentation of illness. The deficiency in the host's cellular immunity is the major risk factor for the illness. Its high incidence in AIDS patients resulted in a growing interest for this deep mycosis in the last two decades. In the State of Parana, the incidence of *Cryptococcosis* associated to AIDS has been decreasing during the last two years (36 cases in 1997 and 24 cases in 1998), the same tendency being detected in the rest of Brazil. The *Cryptococcus neoformans*'s capsule is formed, in its largest portion, by the mucopolysaccharide CXM, that represents the most important fraction of the fungus as far as immunity is concerned; and also representing its major factor of virulence. The capsular antigen GXM shows an intimate correlation with the host's immune system. Various studies show many aspects of this correlation. The present work studies the relationship between the morphometry of the *Cryptococcus neoformans*'s capsule and the number of CD4 lymphocytes in the host and the epidemiological characteristics of the patients. The measurements of the morphometry of the *Cryptococcus neoformans*'s capsule were carried out in the RCL of 30 patients (23 men and 7 women), with average ages of 33,4 for men and 37 for women, all diagnosed with cryptococcal meningitis. From them 25 yeasts and their respective capsules were measured and the capsules' diameter, surface and volume, as well as the relationship between the capsules' / yeasts' diameters were evaluated. An average of the measurements taken in the 26 cells was related to the number of CD4 lymphocytes of the patient being studied. The results of the investigation showed that 28 out of 30 patients were immunodepressed (93,3%), 26 of which had AIDS and 2 presented other immunodepression factors. The remaining 2 (6,6%) were immunocompetents. The antigenemia in the RCL and in the serum, for *Cryptococcus neoformans*, was high (1:10.000 $p < 0,0001$) in the majority of patients, suggesting the severity of the illness. The medication used in the treatment was monotherapy with amphotericin B in 22 (73,4%) patients. Death, caused by cryptococcal meningitis, occurred in 16 (53,3%) patients and, among these, 9 (56,2%) occurred in the first two weeks of treatment. The var. *Neoforms* prevailed in our casuistics (29 out of 30 patients). There was no statistical significance between the number of lymphocytes CD4 and the morphometry of the *Cryptococcus neoformans*'s capsule; and, in the epidemiological aspect of the *cryptococcosis*, a decrease in the incidence among the AIDS patients was detected in the last two years, coinciding with the institution of antiretroviral polychemotherapy in these patients.

1 INTRODUÇÃO

A Criptococose é uma infecção causada pela levedura encapsulada *Cryptococcus neoformans*, que penetra no organismo por via inalatória e, do alvéolo pulmonar, alcança a corrente sanguínea, podendo causar uma micose sistêmica, acometendo vários órgãos. Como o fungo tem tropismo pelo SNC, a meningoencefalite é a forma de apresentação mais comum da doença e com maior taxa de mortalidade.

A Criptococose de SNC é a terceira causa de doença neurológica no paciente com AIDS, com incidência inferior apenas à meningite pelo próprio vírus HIV e à infecção pelo *Toxoplasma gondii* (LEVY; DALE; ROSENBLUM, 1985 e GABUZDA; HIRSCH, 1987).

Dos pacientes com criptococose, cerca de 70% apresentam imunidade comprometida por quimioterapia antineoplásica, por uso de corticóides ou imunossupressores, por serem portadores de linfoma, transplantados e, a grande maioria, devido à AIDS. Os 30% restantes são imunocompetentes (DISMUKES, 1993).

A incidência da criptococose em pacientes infectados pelo HIV varia de 6 a 10 %, sendo que em alguns estudos chegou a ser a primeira manifestação da síndrome em até 45% dos casos (CHUCK; SANDE, 1989).

Cryptococcus neoformans é uma levedura encapsulada, patogênica para o homem e alguns animais (BENNETT; KWON-CHUNG; HOWARD, 1977). A imunogenicidade da cápsula permite que, por reação de antígeno-anticorpo, seja possível determinar 5 diferentes sorotipos de *Cryptococcus neoformans*: A,

D, B, C e AD (WILSON; BENNETT; BAILEY, 1968) que possuem diferentes aspectos bioquímicos, ecológicos, epidemiológicos e genéticos. Por exemplo, no paciente com AIDS, o sorotipo D está mais relacionado com infecção de pele e o sorotipo A com meningite e meningoencefalite (DROMER et al., 1996).

Os sorotipos foram por sua vez agrupados em duas variedades: a var. *neoformans*, que corresponde aos sorotipos A, D e AD, e a var. *gattii* correspondendo aos sorotipos B e C (KWON-CHUNG; BENNETT; THEODORE, 1978).

Considera-se hoje que cada variedade cause uma forma distinta de doença, tanto no aspecto clínico quanto no epidemiológico (SPED; DUNT, 1995).

A cápsula é o maior fator de virulência do *Cryptococcus neoformans*. O polissacarídeo de alto peso molecular, GXM, composto de manose, xilose e ácido glucurônico, compõe 88% da massa capsular do fungo (JAMES; CHERNIAK, 1992).

Os genes CAP59, CAP60 e CAP64 são essenciais na formação da cápsula. A deleção de um deles pode provocar a formação de um *Cryptococcus neoformans* sem cápsula e, conseqüentemente, avirulento (CHANG; KWON-CHUNG, 1998).

O antígeno capsular é detectado por reação de aglutinação passiva com partículas de látex no soro e no LCR, contribuindo para o diagnóstico, prognóstico e monitorização terapêutica da criptococose (TODARO-LUCK et al., 1989).

Quando propágulos de *Cryptococcus neoformans* entram em contato com o hospedeiro por via inalatória, a cápsula está ausente ou é pequena, mas é rapidamente sintetizada (KOZEL, 1984).

A nível de alvéolo pulmonar, o macrófago - primeira célula do hospedeiro a entrar em contato com o *Cryptococcus neoformans* - realiza a fagocitose e induz à produção de linfócitos CD4 que, por sua vez, vão produzir interleucina-2 - que ativa células NK - e interferon- γ , implicados na ativação de mais macrófagos e na destruição do fungo. A presença de cápsula pequena ou a ausência de cápsula influencia positivamente este processo, dificultando assim a disseminação do fungo (VECCHIARELLI et al., 1994).

Em *Cryptococcus neoformans* de cápsula grande, a densidade de fragmentos C3 da cadeia de complemento, responsável pela opsonização, é proporcionalmente menor do que em cápsulas pequenas; isso compromete a fagocitose do *Cryptococcus neoformans* ricamente encapsulado (KOZEL et al., 1996).

Estudos revelaram que a presença da cápsula diminui a capacidade do monócito e do macrófago de induzirem a proliferação de linfócitos T, diminuindo assim a capacidade de resposta do sistema imune do hospedeiro contra o *Cryptococcus neoformans* (COLLINS; BANCROFT, 1991).

O antígeno GXM intensifica a produção de interleucina-10, que é responsável pela redução da secreção do fator de necrose tumoral (TNF- α) e/ou interleucina-1 β , implicados na destruição do *Cryptococcus neoformans* (VECCHIARELLI et al., 1996).

Os linfócitos CD4, CD8, CD56 e células NK estão implicados na destruição e inibição do crescimento do *Cryptococcus neoformans* (LEVITZ; FARRELL; MAZIARZ, 1991).

Altos níveis de antígeno capsular sérico, em modelos animais, podem estimular a produção de linfócitos T supressores pelo sistema imune do hospedeiro (BUCHANAN; FIDEL; MURPHY, 1991).

Todos estes estudos comprovam que a imunidade celular é fundamental para a defesa do hospedeiro contra o fungo em questão. Isto explica a incidência mais comum da criptococose em pacientes com deficiência na imunidade celular (MODY et al., 1990).

O uso de anticorpos monoclonais contra o polissacarídeo capsular em modelos animais mostrou efeito na secreção de citocinas e na proliferação de linfócitos, provando uma ligação entre a resposta imune celular e humoral e sugerindo que anticorpos específicos podem afetar positivamente a imunidade do hospedeiro (VECCHIARELLI et al., 1998).

No paciente com AIDS, a concentração de interleucina-2 pode estar diminuída, afetando assim a função das células NK - estas importantes na destruição do *Cryptococcus neoformans* - logo no seu primeiro contato com o hospedeiro. Isso justifica o fato de alguns pacientes com AIDS, mesmo com o número de linfócitos CD4 próximo do normal, terem maior predisposição à criptococose do que pacientes hígidos (HORN; WASHBURN, 1995).

Em um estudo realizado apenas com *Cryptococcus neoformans* de sorotipo A, o diâmetro da cápsula exerceu uma relação inversa ao estímulo de produção de linfócitos pelo hospedeiro, ou seja, quanto maior a cápsula, maior

a supressão da produção linfocitária e maior a virulência do *Cryptococcus neoformans* (MODY; SYME, 1993).

A cápsula do *Cryptococcus neoformans* foi a estrutura do fungo mais estudada nos últimos anos, provavelmente porque nela se encontra a imunogênese do agente. Através destes estudos, a forma de relação do *Cryptococcus neoformans* com o sistema imune do paciente, principalmente no que diz respeito à imunidade celular, vem sendo esclarecida (COLLIN; BANCROFT, 1991).

No estado do Paraná, a incidência da AIDS aumentou nos últimos 5 anos, principalmente entre as mulheres. Em 1997 foram registrados 1.028 novos casos: 717 do sexo masculino (69,74%) e 311 do sexo feminino (30,25%). No ano de 1998 foram 734 casos: 507 homens (69,07%) e 227 mulheres (30,92%). A criptococose associada à AIDS ocorreu em 36 (3,5% do total de casos no ano) pacientes no ano de 1997 e em 24 (3,26% do total de casos no ano) pacientes em 1998. (*Vide* Anexo 6 com dados do SUS-PARANÁ, 1999).

No Brasil, houve uma queda no número de casos de AIDS nos anos de 1997 e 1998 assim como na incidência de criptococose extra pulmonar em pacientes com AIDS nesse mesmo período (*Vide* Anexo 7).

2 OBJETIVOS

Baseados na exposição acima, os objetivos que nortearam o presente estudo foram os seguintes:

- 2.1 Estudar as características epidemiológicas, clínicas e terapêuticas dos pacientes com criptococose no SNC, observados entre julho de 1997 a novembro de 1998.

- 2.2 Estudar a relação entre as dimensões da cápsula de *Cryptococcus neoformans* e o número de linfócitos CD4 do hospedeiro.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 HISTÓRICO

O patologista alemão Busse (1854) observou pela primeira vez um corpúsculo leveduriforme procedente de uma lesão lítica de tíbia em mulher de 31 anos assistida pelo clínico Buschke. A doença ficou conhecida como Doença de Busse-Buschke.

No mesmo ano, o italiano Sanfelice isolou uma levedura encapsulada em suco de pêssigo, denominando-a *Saccharomyces neoformans* (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). Sanfelice provou sua patogenicidade inoculando a levedura em animais (1865).

Depois de várias denominações diferentes, Vuillemin (1901) enquadrou o fungo no gênero *Cryptococcus* com duas espécies: *Cryptococcus hominis* e *Cryptococcus neoformans* (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

O nome *Torula histolytica* para o fungo e tolurose para a doença foram dados por Stoddard e Cutler (1905) e esses persistiram na literatura até os anos 50.

Versé (1914) descreveu o primeiro caso de meningite criptocócica.

Benham (1935) concluiu que os gêneros *Saccharomyces*, *Cryptococcus* e *Torula* constituíam um mesmo grupo, ficando então estabelecido tratar-se do gênero *Cryptococcus* com uma espécie - *Cryptococcus homini* - e duas variedades (BENHAM, 1935).

Evans (1949) identificou os sorotipos A, B e C (EVANS; KESSEL, 1950); e só 20 anos depois o sorotipo D foi identificado por Vogel.

Nos Estados Unidos – Virgínia - Emmons (1951) isolou pela primeira vez o *Cryptococcus neoformans* de fonte natural, fezes de pombos e de solo contaminado com as mesmas (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

Zimmerman e Rappaport (1954) atentaram para a freqüente associação da criptococose com desordens malignas do sistema linfático.

Progressos na identificação do fungo tiveram como fatos marcantes a introdução do teste da urease como *screening*, por Seeliger (1956), e o uso de ágar niger como meio seletivo de crescimento do *Cryptococcus neoformans*, por Staib (1962) (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

Gatti e Eeckels (1970) descobriram um *Cryptococcus neoformans* baciliforme causando meningite em uma menina na África (VANBREUSEGHEM; TAKASHIO, 1970).

Kwon-Chung (1978) separa os quatro sorotipos em duas variedades: A e D variedade *neoformans*, B e C var. *gattii* (KWON-CHUNG; BENNETT; THEODORE, 1978 e KWON-CHUNG; POLACHECK; BENNETT, 1982).

Os pesquisadores australianos, Ellis e Pfeifer (1990), estabeleceu uma relação entre a var. *gattii* e o *Eucalyptus camaldulensis*, natural da Austrália (ELLIS; PFEIFFER, 1990).

No Brasil, o primeiro caso de meningite criptocócica pela var. *gattii* foi descrito em 1989 (ROZENBAUM et al., 1990).

3.2 DEFINIÇÃO

A criptococose é uma micose profunda causada pelo fungo *Cryptococcus neoformans*, que tem como porta de entrada o pulmão e um

tropismo pelo SNC. A meningite criptocócica é a apresentação clínica mais comum da doença (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

3.3 AGENTE ETIOLÓGICO

O *Cryptococcus neoformans* é uma levedura encapsulada, ubíqua, que se reproduz por gemulação na sua forma assexuada. A levedura mede de 3 a 8 μ de diâmetro e sua cápsula, de mucopolissacarídeo refringente, pode variar de 1 a 30 μ (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991).

As células de *Cryptococcus neoformans* são geralmente esféricas ou globosas, apresentam-se em pares ou em pequenos grupos. O brotamento pode ser único ou duplo em qualquer parte da célula-mãe (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991).

A espécie *Cryptococcus neoformans* se divide em duas variedades: a var. *gattii* e a var. *neoformans* (KWON-CHUG; POLACHECK; BENNETT, 1982), e cinco sorotipos (SALKIN; HURD, 1982). A var. *neoformans* inclui os sorotipos A, De AD. A var. *Gatti*, os sorotipos B e C (KWON-CHUNG; BENNETT; THEODORE, 1978).

No seu estado sexuado, o *Cryptococcus neoformans* é um basideomiceto pertencente ao gênero *Filobasidiella* e se reproduz à temperatura de 25 graus centígrados pela conjugação de duas cepas (α e a). O resultado é a formação de pseudo-hifas que podem germinar produzindo células leveduriformes. (KWON-CHUNG, 1975).

Ao contrário das formas não patogênicas, o *Cryptococcus neoformans*, além de crescer em temperatura ambiente, tem a capacidade de se desenvolver à temperatura de 37 graus centígrados. Em ágar Sabouraud, as colônias têm

tonalidade creme e aspecto brilhante, viscoso e úmido. No meio de cultura contendo extrato de semente de *Guizotia abyssinica* (ágar niger) ou ágar L-Dopa, o *Cryptococcus neoformans*, através de sua enzima fenoloxidase, oxida o ácido cafeico presente no meio produzindo melanina e dando com isto a coloração acastanhada às suas colônias (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

O *Cryptococcus neoformans* é o único do gênero *Cryptococcus* capaz de produzir melanina. Estudos sugerem que a melanina depositada na parede celular do fungo intensifica a defesa do microorganismo contra o sistema imune do hospedeiro. Observa-se também que quanto maior a espessura da cápsula, menos intensa é a deposição de melanina, sugerindo que, em cápsulas pequenas, a melanina tem efeito compensatório de proteção do fungo contra o sistema imune do hospedeiro (KWON-CHUNG; RHODES, 1986).

Além disso, este pigmento é resistente à ação de radicais livres, agentes antifúngicos (como a anfotericina B) e apresenta maior resistência à ação de macrófagos em modelo animal (WANG; AISEN; CASADEVALL, 1995).

O *Cryptococcus neoformans* assimila o inusitol como fonte de carbono e não assimila nitrato de potássio, lactose e melibiose. A capacidade de hidrolizar a uréia permite uma identificação bioquímica preliminar do *Cryptococcus neoformans* (ZIMMER; ROBERTS, 1979).

A cápsula do *Cryptococcus neoformans* é a estrutura mais estudada. É formada de polissacarídeos, o mais importante dos quais é a glucoronoxilomanose (GXM). Este polissacarídeo determina os sorotipos, dificulta a fagocitose pelos macrófagos e neutrófilos do hospedeiro, permite testes sorológicos no sangue e líquidos corporais - que têm valor diagnóstico e prognóstico (BHATTACHARJEE; BENNETT, 1984) - além de estar implicado

na baixa produção de interleucina-1 β e TNF- α pelos monócitos humanos (RETINI et al., 1996).

Cryptococcus neoformans pobremente encapsulados têm sido descritos como causadores de meningite em pacientes com AIDS (BOTTONNE et al., 1986). Existe uma regulação dinâmica entre o diâmetro da cápsula *in vivo* de acordo com as condições a que o fungo está exposto (BOTTONNE; WORMSER, 1986).

3.4 VARIEDADE *NEOFORMANS*

Em 1955 foi estabelecida a relação ecológica entre o *Cryptococcus neoformans* e fezes de pombos. Desde então, ele tem sido isolado de fezes de canários, papagaios, pardais, galinhas e de pássaros mumificados (HAJJEH; BRANDT; PINNER, 1995). Geralmente são fezes secas ou solo contaminado com as mesmas.

O fungo é cosmopolita, não tem sido isolado em fezes frescas de aves, prefere pH neutro, não gosta de anaerobiose, altas temperaturas, luz solar direta e presença de *Acanthamoeba polyphaga* no solo (RUIZ; FROMTLING; BULMER, 1981).

Recentes estudos no Brasil levaram à identificação de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* em ocos de árvores e relaciona o fungo com madeira em decomposição (LAZERA et al., 1996).

O *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* não causa doença no pombo, provavelmente por sua temperatura corporal alta (40 graus centígrados) impedir o crescimento do fungo. No entanto, já foram isolados *Cryptococcus neoformans* no bico e patas de pombos (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

Cavalos, gatos, porcos, porcos da Guiné, furões, besouros, macacos e gado já foram acometidos por criptococose causada por *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (HAJJEH; BRANDT; PINNER, 1995).

Em meio ágar CGB, a var. *neoformans* deixa o meio na sua cor natural (amarelada) (KWON-CHUNG; POLACHEK; BENNETT, 1982). A levedura tem forma globosa e são fungos oportunistas que geralmente causam doença em hospedeiros com algum tipo de deficiência imunológica. A infecção por esta variedade apresenta um índice de mortalidade maior quando comparado com a var. *gattii* (SPED; DUNT, 1995).

3.5 VARIEDADE *GATTII*

O nicho ecológico do *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* só foi descoberto em 1990 quando os pesquisadores australianos, Ellis e Pfeifer, estudando regiões de alta prevalência de criptococose pela var. *gattii* (principalmente em aborígenes australianos), conseguiram isolar o fungo de flores, folhas, caule, húmus e do ar próximo ao *Eucalyptus camaldulensis* natural da Austrália (ELLIS; PFEIFFER, 1990).

Também foi detectado *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* em patas e fezes de coalas australianos que se alimentam das folhas de eucaliptos (HAJJEH; BRANDT; PINNER, 1995).

Acredita-se que a disseminação do *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* para o restante do mundo se deu pela exportação de mudas e sementes do *Eucalyptus camaldulensis* para as regiões tropicais e subtropicais como: Nova Guiné, Sul da Califórnia, parte da África, Sudeste Asiático, México, Brasil e

Paraguai. As áreas de clima tropical e temperado são de sua preferência. (ELLIS; PFEIFFER, 1990).

Estudos recentes, usando engenharia genética, relacionam a var. *gattii* do *Cryptococcus neoformans* com outras espécies de eucaliptos e, em muitos casos, não conseguem estabelecer relações epidemiológicas em casos de criptococose cujo nicho ecológico do agente causador não foi encontrado naquela região (SORRELL et al., 1996).

Em 1993, um estudo brasileiro isolou a var. *gattii* do *Cryptococcus neoformans* em fezes de morcegos na cidade do Rio de Janeiro (LAZERA; WANKE; NISHIKAWA, 1993).

Além de diferenças geográficas, a var. *gattii* se diferencia da var. *neoformans* por ser considerada um patógeno em potencial, causando doença em hospedeiros imunocompetentes. Nestes hospedeiros a mortalidade é mais baixa, mas a recidiva da infecção após o tratamento é mais comum. (SPED; DUNT, 1995).

No meio seletivo CGB, a var. *gattii* faz com que o meio se torne azul em dois a sete dias. Isto acontece provavelmente por a var. *gattii* produzir mais amônia do que a var. *neoformans*. A acurácia do exame é de 97% nas primeiras 48 horas e 100% em 7 dias (KWON-CHUNG; POLACHECK; BENNETT, 1982).

3.6 ROTA DA INFECÇÃO

Leveduras dessecadas, blastoconídeos ou basidiósporos são introduzidos no hospedeiro por via inalatória; partículas com 2 a 3 μ de diâmetro atingem o alvéolo pulmonar, são recebidas por células do sistema imunológico do

hospedeiro; conseguindo ultrapassá-las, caem na corrente sanguínea e atingem o SNC e ou outros órgãos onde vão causar doença (HAJJEH; BRANDT; PINNER, 1995).

3.7 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

3.7.1 Pacientes sem AIDS

A var. *gattii* é mais incidente entre os pacientes imunocompetentes do que a var. *neoformans* (SPED; DUNT, 1995). A manifestação clínica mais comum é a meningoencefalite. O início da doença é geralmente insidioso e o paciente pode ficar semanas ou meses com febre baixa e cefaléia antes que a doença seja diagnosticada. Sinais de irritação meníngea são incomuns. Sem tratamento antifúngico, a meningoencefalite é invariavelmente fatal e, com o tratamento, a mortalidade é de 22% ou mais (DISMUKES, 1993).

O comprometimento pulmonar é muito variável, podendo ir de uma simples colonização de vias aéreas pelo *Cryptococcus neoformans* a lesões visíveis à radiografia de tórax, cuja forma de apresentação mais comum é a pneumonite circunscrita, mas também podendo se apresentar como nódulos múltiplos ou solitários, consolidações lobares, grandes massas simulando tumores, cavidades e derrames pleurais (estes dois últimos mais raros) (BAIRD; GARFIELD, 1994).

Em pacientes imunocompetentes, a regressão espontânea das lesões é regra mas, quando estas funcionam como fonte de disseminação para o SNC, requer tratamento (DISMUKES, 1993). Os pacientes são geralmente oligo ou assintomáticos e o diagnóstico é feito por radiografia de tórax.

Noventa e dois por cento dos pacientes com criptococose pulmonar têm doença imunossupressora de base e 42% têm concomitância de envolvimento pulmonar e de SNC ou outro órgão (HAJJEH; BRANDT; PINNER, 1995).

Outros órgãos podem ser acometidos pela criptococose: pele, laringe, (KERSCHNER; RIDLEY & GREENE, 1995), próstata (LARSEN et al., 1989), supra-renais, ossos, articulações, rins, seios da face, endocárdio, linfonodos, olhos, fígado, esôfago, estômago, intestino, peritônio (MABEE et al., 1995), próteses de válvulas cardíacas, trato genital feminino, e outros (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

3.7.2 Pacientes com AIDS

A criptococose é a primeira manifestação da AIDS em uma porcentagem variada de doentes e é a quarta causa infecciosa de morte no paciente com AIDS, perdendo apenas para a tuberculose, a pneumocistose e a citomegalovirose (KOVACS et al., 1985). Representa a terceira causa de doença neurológica no paciente com AIDS, sendo apenas menos incidente que o vírus HIV e o *Toxoplasma gondii* (DISMUKES, 1988).

A var. *gattii* é muito pouco prevalente em pacientes com AIDS. A causa desta diferença não está completamente esclarecida na literatura (SPED; DUNT, 1995).

A apresentação clínica da doença é semelhante a dos pacientes sem AIDS (febre, cefaléia, rigidez de nuca, alteração do nível de consciência que vai desde sonolência ao coma profundo), com exceção de algumas características: disseminação com maior frequência, doença pulmonar mais sintomática,

recidivas frequentes, prognóstico mais reservado, apesar do tratamento (HAJJEH; BRANDT; PINNER, 1995).

A próstata tem sido sugerida como o principal local de latência do *Cryptococcus neoformans* responsável pelas recidivas da doença (LARSEN et al., 1989).

A mortalidade durante a terapia inicial é de 10 a 25%, e em 12 meses de 30 a 60% (CHUCK; SANDE, 1989).

3.8 DIAGNÓSTICO

A cultura do fungo é o teste diagnóstico mais definitivo.

A hemocultura é positiva em 10% dos casos (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). Pesquisa direta para fungos em LCR corado por tinta nanquim possibilita o diagnóstico em 50 a 88% dos casos de meningite criptocócica (KOVACKS et al., 1985).

Testes sorológicos de aglutinação com partículas de látex para a detecção do antígeno capsular criptocócico têm sensibilidade maior que 90% (POWDERLY et al., 1994).

Em pacientes com AIDS, a aglutinação com partículas de látex é importante fator prognóstico e de monitorização da resposta terapêutica.

Também contribuem para o diagnóstico: radiografia de tórax, tomografia computadorizada de crânio e de tórax, estudo histológico, reação da polimerase em cadeia (CHEN et al., 1996) e outros.

3.9 TRATAMENTO

O uso de anfotericina B na dose de 0.3 a 0.7mg/Kg/dia endovenosa associada com 150mg/Kg/dia de 5-fluorocitosina via oral dividida em quatro doses diárias, por quatro a seis semanas, permite um índice de “cura” de 65% a 75% nos pacientes com AIDS (MEYER, 1992).

O uso da anfotericina B sem a 5-fluorocitosina no tratamento de ataque da meningite criptocócica em pacientes com AIDS foi avaliado e sua eficácia em negativar o LCR em duas semanas foi de 51% contra 59% da combinação anfotericina B + 5-fluorocitosina ($p = 0.06$) (VAN der HORST, 1995). No Brasil, esta associação não é usada como rotina devido à indisponibilidade no comércio nacional da 5-fluorocitosina, seu alto custo e devido aos bons resultados obtidos com a anfotericina B isolada (CAMPOS et al., 1992).

Não deve ser esquecida a toxicidade renal da anfotericina B em 80% dos casos (SUGAR, 1990) e a leucopenia em sangue periférico que a 5-fluorocitosina pode causar, principalmente em se tratando de pacientes já imunocomprometidos.

Estudos com dosagens de fluconazol 800mg ou mais por dia em pacientes com grave infecção fúngica mostrou sucesso no tratamento em 56% dos casos, com boa tolerabilidade (DUSWALD; PENK; PITROW, 1997). No entanto, a taxa de recidiva e a mortalidade são menores nos pacientes tratados com anfotericina B em comparação daqueles tratados apenas com fluconazol (LARSEN; LEAL; CHAN, 1990).

Para pacientes com AIDS, a “cura” é definida como resolução clínica dos sintomas, acompanhada de cultura negativa para *Cryptococcus neoformans*

no LCR. A recidiva da doença é muito comum nestes pacientes e o tratamento de manutenção é sempre requerido (DISMUKES, 1993).

Como tratamento de manutenção podem ser usados 400mg/dia de itraconazol ou 200mg/dia de fluconazol por via oral (SAAG et al., 1995). Uma opção mais barata é o uso de anfotericina B endovenosa em doses semanais.

A imunomodulação usada no tratamento da infecção pelo *Cryptococcus neoformans*, ainda em estudos, será com certeza uma nova opção, principalmente no tratamento de manutenção de pacientes com dificuldades econômicas na aquisição do fluconazol e itraconazol por tempo tão prolongado (GRAYBILL, 1997).

O tratamento de pacientes com meningite criptocócica e que não estão infectados pelo vírus HIV não tem sido estudado recentemente. Sendo assim, o tratamento nestes casos é o mesmo aplicado aos pacientes com AIDS, levando apenas em consideração que a recidiva é menos comum e o tratamento por toda vida não se faz necessário (GRAYBILL, 1997).

3.10 FATORES PROGNÓSTICOS

3.10.1 Pacientes sem AIDS

Fatores que indicam pior prognóstico: alta pressão líquórica, baixo nível líquórico de glicose, número de leucócitos no LCR menor que 20 cels/mm³, presença de *Cryptococcus neoformans* em esfregaço de LCR corado com tinta nanquim, título de antígeno capsular do LCR ou soro maior que 1:32, isolamento do *Cryptococcus neoformans* em uma ou mais espécimes além do LCR, presença de doença maligna do sistema linforreticular associada ou uso crônico de corticóides (DIAMOND; BENNETT, 1974).

3.10.2 Pacientes com AIDS

Fatores que indicam pior prognóstico: estado mental alterado, altos títulos de antígeno capsular no LCR (maior que 1:1054), baixa contagem de leucócitos no LCR (menor que 20 células por milímetro cúbico), idade menor que 35 anos, cultura positiva para *Cryptococcus neoformans* extra-meningea e hiponatremia (CHUCK; SANDE, 1989).

3.11 A CRIPTOCOCOSE NO PARANÁ

Poucos estudos em criptococose foram realizados no Paraná antes de 1994. Desse ano em diante, o Laboratório de Micologia Médica do Hospital de Clínicas da UFPR capacitou-se para realizar a separação das variedades *gattii* e *neoformans* do *Cryptococcus neoformans*. Esta inovação abriu novos horizontes para o estudo da criptococose, tanto no aspecto clínico como epidemiológico (BORDIGNON, 1994).

QUEIROZ-TELLES et al. - em 1997 - relataram caso de paciente com meningoencefalite e lesão pulmonar tumoral por *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, que foi acompanhado pelos serviços de Neurologia e de Doenças Infecto-parasitárias do Hospital de Clínicas da UFPR. Tratava-se de paciente imunocompetente manejado com itraconazol, que teve boa evolução clínica. A lesão pulmonar necessitou ser ressecada pois se comportava como fonte de recidiva da meningite (QUEIROZ-TELLES et al., 1997).

Colombo et al. analisaram amostras de *Cryptococcus neoformans* isoladas de pacientes e do meio ambiente, identificando-as no que diz respeito à variedade e sorotipos além de avaliar sua sensibilidade *in vitro* frente a fluconazol, itraconazol, cetoconazol, anfotericina e 5-fluorocitosina. Concluiu-se

que as amostras se mostraram sensíveis às drogas testadas, com exceção à 5-fluorocitosina que apresentou sensibilidade intermediária. Não houve, no estudo, diferenças no padrão de sensibilidade entre as diferentes variedades (COLOMBO et al., 1999).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Foi realizado um estudo prospectivo e observacional no período de julho de 1997 a novembro de 1998 em amostras de LCR, coletadas por punção lombar, provenientes de pacientes portadores de neurocriptococose, diagnosticados no Laboratório de Micologia do Hospital de Clínicas da UFPR. Todos os casos apresentavam exame micológico direto de LCR sugestivo de *Cryptococcus sp*, estudados pela coloração de nigrosina ou tinta nanquim.

Os dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais dos pacientes foram obtidos através de prontuários médicos ou de informações colhidas diretamente com o médico responsável pelo paciente e registradas em ficha de coleta. (*Vide* Anexo 1)

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Confirmação Diagnóstica

A. Micológico Direto

Inicialmente, 1 (um) ml do LCR a ser estudado - com até seis horas da coleta e conservado em geladeira - foi colocado em tubo de ensaio de vidro cônico e estéril, com capacidade para 10ml, e então centrifugado em centrífuga (Celm-LS-3) a 1500 RPM por três minutos.

Após a centrifugação, com uma pipeta de vidro Pasteur estéril, uma gota do sedimento do LCR foi depositada em três lâminas de vidro 76X26mm, as quais continham previamente uma gota de tinta nanquim. Com uma lamínula de vidro 18X18mm, a gota de LCR foi misturada à tinta nanquim e, logo em

seguida, a mesma lamínula era depositada suavemente sobre o LCR corado (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991).

Usando um microscópio Nikon Alphaphot-2 YS2, o LCR foi analisado inicialmente na objetiva de 10 vezes, para localizar as leveduras, e depois 40 vezes, para melhor observá-las. Pelo aspecto morfológico das leveduras, eram caracterizadas como sugestivas de *Cryptococcus sp.* (Vide Anexo 8)

B. Análise dos Isolados

a. Cultura para Fungos: Usando uma pipeta de vidro estéril e a proximidade da chama, uma gota do sedimento do LCR foi depositada em placa contendo ágar Sabouraud e outra placa contendo ágar niger.

Estes meios de cultura foram cuidadosamente identificados com o nome do paciente, registro do hospital de origem e nome de quem semeou. A conservação das placas já semeadas foi feita em estufa (002 CB da Fanem LTDA) a 30 graus centígrados. A observação das placas foi realizada diariamente, na tentativa de identificar crescimento de colônias fúngicas.

Quando ocorria crescimento de colônias, eram realizados testes para identificação do fungo por assimilação de carboidratos e uso de meios seletivos (Vide Anexo 3).

b. Identificação da Variedade: Uma colônia foi separada e semeada no meio CGB, a fim de identificar a variedade - se *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* ou *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. A var. *gattii* torna o meio de CGB azul e, na var. *Neoformans*, o meio permanece na sua cor original (KWON-CHUNG; POLACHECK; BENNETT, 1982).

c. **Diagnóstico Sorológico:** A porção sobrenadante do líquido centrifugado foi submetida à análise quantitativa de antígeno capsular do *Cryptococcus neoformans* por prova de aglutinação por partículas de látex (KAUFMAN; REISS, 1992) usando kit Pastorex® *Cryptococcus* da Sanofi Pasteur e *Cryptococcus Antigen Latex Agglutination System (CALAS)* da Meridian Diagnostics.

A prova de aglutinação por partículas de látex também foi realizada no soro de cada paciente estudado.

4.2.2 Análise das Dimensões da Cápsula do *Cryptococcus neoformans*

Uma lâmina contendo uma gota de sedimento do LCR em estudo, corada com tinta nanquim, foi analisada em microscópio (Nikon Alphaphot-2 YS2) acoplado à ocular para mensuração (Ernest Leitz Wetzlar) com capacidade de aumento de 12,5 vezes, usando-se inicialmente uma objetiva com capacidade de aumento de 10 vezes a fim de localizar as leveduras e, em seguida, a de 40 vezes para realizar a mensuração do diâmetro da levedura e da sua respectiva cápsula. Os valores encontrados foram transformados em micrômetro (μ) segundo a fórmula abaixo (VERNA; HERRERO, 1952):

$117 \text{ divisões da ocular } \underline{\hspace{2cm}} \quad 10 \mu$
$\text{Número de divisões da ocular encontrado } \underline{\hspace{2cm}} \quad X \text{ (em } \mu \text{)}$
$X = \frac{\text{Número de divisões da ocular encontrado em determinada medida} \times 10}{117}$
$X = \text{medida da estrutura em questão dada em } \mu$

O número de divisões da ocular que equivale a 10μ foi conseguido através de uma inicial calibração do microscópio acoplado à ocular de

mensuração e a uma lâmina graduada (Bausch & Lomb) com divisões na horizontal que equivalentes a 10μ cada.

Para cada caso estudado foram mensuradas 25 células leveduriformes, em primeiro lugar medindo o diâmetro da levedura e depois o diâmetro total da célula, incluindo sua cápsula.

Após a medida das 25 células e realizada a transformação numérica para μ , como mostra a regra acima citada, foi subtraído do valor do diâmetro total da célula o valor do diâmetro da levedura a fim de que esse resultado mostrasse apenas o diâmetro da cápsula do *Cryptococcus neoformans*.

Além do diâmetro da cápsula, foi também calculado para cada célula a relação cápsula/levedura, dividindo-se o diâmetro total da célula pelo da levedura; o volume total da célula e da levedura ($\text{Volume} = \frac{3}{4} \times \text{raio}^3 \times \pi$) dado em μ^3 ; e também a superfície total da célula e da levedura ($\text{Superfície} = \pi \times \text{raio}^2$) dada em μ^2 .

Em seguida, do volume e da superfície total da célula foram subtraídos o volume e a superfície da levedura, respectivamente, chegando-se então ao volume e superfície da cápsula (KOZEL et al., 1996).

Finalmente, foi realizada para cada caso uma média aritmética dos diâmetros da cápsula, da relação cápsula/ levedura, dos volumes e das superfícies das cápsulas das 25 células estudadas.

As leveduras mensuradas foram escolhidas de modo aleatório, respeitando a seqüência de varredura da lâmina de cima para baixo e da direita para esquerda. Algumas vezes, para completar o total de 25 leveduras, mais de uma lâmina corada foi necessária para o estudo.

Quando a levedura era alongada, mediu-se o seu maior diâmetro.

4.2.3 Análise do CD4

A análise do nível de imunidade celular do paciente foi representada pela quantificação de linfócitos CD4 no sangue do paciente através de citometria de fluxo (FACS VANTAGE - BD) (GIORGI et al., 1990).

Foram considerados apenas valores verificados até 30 dias antes ou 30 dias depois da coleta do LCR.

4.2.4 Análise Estatística dos Dados

Recorreu-se à análise descritiva dos dados através de tabelas.

Para a comparação das hipóteses levantadas foram utilizados os testes paramétrico “t de student” e os não-paramétricos “Mann-Whitney” (obtidos através do software “Primer of Biostatistics”) e “Exato de Fisher” (pelo software “Epi-Info”), em todos os casos para amostras independentes.

O nível de significância (ou probabilidade de significância) mínimo adotado foi de 5%.

Em situações onde o desvio padrão tinha valores altos, foi utilizada a mediana.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS

Foram estudados 30 pacientes com neurocriptococose, a maioria procedente do município de Curitiba e municípios da região metropolitana (73,33%), apresentando profissões variadas e internados em quatro diferentes hospitais de Curitiba (*Vide Anexo 2*).

A AIDS foi a doença de base mais freqüente entre os pacientes estudados, sendo que em quatro pacientes (13, 33%) a meningite criptocócica foi a primeira manifestação da AIDS. Em dois pacientes a imunodepressão se deu por outras doenças e nos demais não foi comprovada imunodepressão.

TABELA 1 – Características epidemiológicas de 30 pacientes estudados.

DADOS	NÚMERO (n = 30)	PERCENTUAL
SEXO		
• Masculino	23	76,7
• Feminino	07	23,3
DOENÇA DE BASE		
• AIDS	26	86,7
• LES	01	3,3
• Transplantado Renal	01	3,3
• Hígido	02	6,7
PROCEDÊNCIA		
• Capital (Curitiba)	18	60,0
• Interior	08	26,7
• Outro Estado	04	13,3
IDADE (em anos)		
	MÉDIA	Varição
• Sexo Masculino	33,4	(24 - 49)
• Sexo Feminino	37	(27 - 47)

5.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

A forma clínica da criptococose foi meningite em 29 pacientes (96,66%) e apenas um paciente (3,33%) apresentou meningoencefalite, registrada por tomografia computadorizada de crânio e ressonância magnética.

A medicação utilizada no tratamento foi anfotericina B endovenosa em 22 pacientes (73,33%) e a associação anfotericina B e fluconazol - ambas endovenosas - foi usada em sete pacientes (23,33%). Apenas um paciente não recebeu medicação pois foi a óbito antes de iniciar o tratamento.

Dos pacientes estudados, 14 (46,66%) foram de alta hospitalar, sendo 11 (36,66%) por melhora clínica e plano de tratamento ambulatorial e três (10%) sem ordens médicas (um por alta a pedido do paciente, dois por evasão hospitalar).

Óbito tendo como causa a meningite criptocócica se deu em 16 pacientes (53,33%) num período de internamento que variou de 1 (um) a 124 dias. (*Vide Anexo 4*)

TABELA 2 – Características clínicas da amostra estudada.

DADOS	NÚMERO (n = 30)	PERCENTUAL
MEDICAÇÃO		
• Anfotericina B	22	73,4
• Anfotericina B+ fluconazol	07	23,3
• Não Fez	01	3,3
FORMA CLÍNICA		
• Meningite	29	96,7
• Meningoencefalite	01	3,3
EVOLUÇÃO		
• Alta	12	40,0
• Evasão Hospitalar	02	6,7
• Óbito	16	53,3

5.3 CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS

5.3.1 Achados micológicos

A cultura para fungos foi positiva em todas as amostras de LCR e a identificação das variedades mostrou 29 pacientes como sendo da var. *neoformans* e apenas um como sendo *gattii*. Os testes bioquímicos para a

identificação das espécies de *Cryptococcus* foram realizados em 29 das 30 culturas isoladas de LCR.

TABELA 3: Provas bioquímicas e meios seletivos usados na identificação do *Cryptococcus neoformans* e de suas variedades, realizadas em 30 amostras de LCR:

Nº	Des-tro-se	Mal-tose	Sa-ca-ro-se	Lac-tose	Ga-lac-tose	Me-labl-ose	Ce-lulo-se	Ino-sítol	Xilo-se	Rafi-nose	Tre-alo-se	Dul-citol	Ure-ase	Cres-ci-men-to a 37º	Ní-ger *	CG B**
1	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
2	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
3	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
4	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
5	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
6	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
7	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
8	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
9	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
10	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
11	+	+	+	-	+	-	S/D	+	+	-	+	+	+	+	+	-
12	+	+	+	-	+	-	S/D	+	+	-	-	+	+	+	+	-
13	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	-	+	-	S/D	+	+	+	+	+	+	+	+	-
15	+	+	+	-	+	-	S/D	+	+	+	+	+	+	+	+	-
16	+	+	+	-	+	-	S/D	+	-	-	-	+	+	+	+	-
17	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
18	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
19	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
20	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
21	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
22	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
23	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
24	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	+	+	+	-
25	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
26	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
27	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
28	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
29	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
30	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-

+ = positivo
- = negativo

S/D = sem disco para realizar o teste
AI = amostra inviável para realizar o teste

* = colônias castanhas em ágar niger
** = torna azul o meio CGB

5.3.2 Achados sorológicos

A aglutinação por partículas de látex foi realizada tanto no LCR (em 24 pacientes) quanto no soro (em 29 pacientes) e os resultados mostraram altas taxas de antígeno capsular em grande número de doentes.

TABELA 4 – Características sorológicas de 30 pacientes com neurocriptococose.

DADOS	Nº de pacientes	PERCENTUAL
LÁTEX NO SORO		
• 1 : 10	01	3,3
• 1 : 100	02	6,7
• 1 : 1000	05	16,72
• 1 : 1024	01	3,3
• 1 : 10000*	20	66,7
• Não Realizado	01	3,3
LÁTEX NO LCR		
• 1:100	04	13,3
• 1:1000	06	20
• 1:10000*	16	53,3*
• Não Realizado	04	13,3

* $p < 0,001$

5.3.3 Achados Liquóricos

Foram valorizados dados liquóricos como: glicose, proteínas, celularidade global, percentual de linfócitos e local de punção (todos foram lombares).

TABELA 5 – Características liquóricas de 30 pacientes com neurocriptococose.

CARACTERÍSTICAS DO LCR	Nº	MEDIANA
• Celularidade (cel/mm ³)	28	15,5
• Percentual de linfócitos	21	68
• Proteína (mg/dl)	27	72
• Glicose (mg/dl)	27	40

5.4 CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DA CÁPSULA E LINFÓCITOS CD4

Para melhor análise dos dados, a amostra foi dividida em dois grupos de pacientes: com número de linfócitos CD4 maior que 200cel/mm³ e menor que 200 cel/mm³, sendo realizadas comparações entre número de linfócitos CD4 e características morfométricas da cápsula do *Cryptococcus neoformans*. Também foi analisado o tempo de evolução da doença (em dias) entre o diagnóstico e o óbito.

TABELA 6 - Análise do número de linfócitos CD4, características morfométricas da cápsula e tempo de evolução em pacientes com CD4 menor que 200cel/mm³:

DADOS	Número	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Valor de P	Mediana
CD4	24	26,0	20,2	2,0	68,0	$P < 0,0001$	19,0
Diâmetro Cápsula / Levedura	24	2,58	0,38	2,07	3,74	$p = 0,662$	-
Cápsula							
• Diâmetro	24	9,30	2,56	5,06	14,66	$P = 0,732$	-
• Superfície	24	166,74	80,88	56,54	426,79	$P = 0,938$	153,05
• Volume	24	1 336,14	1 153,16	252,99	5 717,26	$P = 0,586$	1 023,79
Tempo de Evolução	13	19,2	32,9	1,0	124,0	$P = 0,196$	6,0

TABELA 7 - Análise do número de linfócitos CD4, características morfométricas da cápsula e tempo de evolução em pacientes com CD4 maior que 200cel/mm³:

DADOS	Número	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Valor de P	Mediana
CD4	06	614,0	335,7	220,0	1 231,0	$p < 0,0001$	562,5
Diâmetro Cápsula / Levedura	06	2,41	0,59	1,58	3,19	$p = 0,662$	-
Cápsula							
• Diâmetro	06	9,53	4,41	5,03	17,88	$p = 0,732$	8,69
• Superfície	06	200,02	153,94	118,55	512,67	$p = 0,938$	148,47
• Volume	06	1 893,93	1 992,03	730,93	5 879,51	$p = 0,586$	1 045,45
Tempo de Evolução	03	31,3	28,4	8,0	63,0	$p = 0,196$	23,0

Além do valor de linfócitos CD4 ($p < 0,0001$), usado como critério na divisão dos grupos, não houve significância estatística entre as variáveis comparadas.

6 DISCUSSÃO

A incidência de meningite criptocócica, assim como a de outras infecções oportunistas em pacientes com AIDS, vem diminuindo nos últimos dois anos no estado do Paraná (SUS - PARANÁ, 1999) bem como no restante do país (*Vide* Anexos 6 e 7). Esta redução de incidência coincide com a instituição da poliquimioterapia antiretroviral no tratamento desses pacientes. No período de 1994 a 1997 foi realizado um estudo em nove grandes centros de tratamento da AIDS nos Estados Unidos, no qual se observou significativa queda na mortalidade e morbidade em pacientes com AIDS e número de linfócitos CD4 menor que 100cel/mm³, resultado do uso da poliquimioterapia antiretroviral contendo pelo menos um inibidor de protease (PALELLA et al., 1998).

Em nossa casuística, 93,3% dos pacientes eram imunodeprimidos, tendo como doença de base mais freqüente a AIDS (86,7%). Dismukes (1993) relatou que em 70% dos pacientes com criptococose existe algum fator de imunodepressão, sendo a AIDS o mais comum entre eles desde o seu surgimento em 1980. A neurocriptococose foi a primeira manifestação da AIDS em 13,33% no presente estudo. Chuck e Sande (1989), estudando 106 pacientes com AIDS, observaram criptococose (meningite e outras formas clínicas) como primeira manifestação da síndrome em 45% dos pacientes.

Em relação à variedade de *Cryptococcus neoformans* prevalente em nossa casuística, a var. *neoformans* prevaleceu entre os casos (96,6% dos pacientes). Sped e Dunt (1995), estudando diferenças clínicas e epidemiológicas entre as duas variedades, relataram a maior incidência da var.

gattii nos pacientes imunocompetentes (90%) e sua raridade entre os imunodeprimidos, ao contrário da var. *neoformans*, mais incidente entre os imunodeprimidos. O único paciente infectado por *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (paciente número 13) trabalhava em uma indústria de benefício de madeira. Esta também era a profissão do caso relatado por Queiroz-Telles et al. (1997), em que a var. *gattii* também era o agente da infecção. K. H. Kohl e colaboradores (1985), chamaram atenção para relação entre a variedade *gattii* e a poeira de madeira em paciente com meningoencefalite de repetição por *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, que trabalhava em fábrica de benefício de madeira - inclusive derivadas de árvores tropicais. Os autores não conseguiram isolar o organismo da fonte natural.

Foram estudadas no LCR dosagem de glicose, proteínas, celularidade global e percentual de linfócitos. A dosagem de proteínas (mediana 72mg/dl) e a celularidade global (mediana 15cel/mm³) estavam aumentadas na grande maioria de pacientes. Kovacs e colaboradores (1985), estudando 27 pacientes com criptococose e AIDS, observaram que nesses pacientes a celularidade global era menor que 5 cel/mm³ em 11 dos 17 pacientes, a dosagem de glicose maior que 40mg/dl em 11 dos 16 pacientes e a dosagem de proteínas só foi normal (menor que 45mg/dl) em 5 de 16 pacientes - não relatado percentual de linfócitos.

Matas (1992), estudando dois grupos de pacientes com neurocriptococose, o primeiro (41 pacientes) sem AIDS e o segundo (23 pacientes) com AIDS, constatou que as características líquóricas do grupo com AIDS tendiam mais à normalidade, sugerindo que a reação inflamatória a nível de SNC é menos intensa, provavelmente pela imunodepressão destes pacientes.

Em relação à medicação administrada para o tratamento da meningite criptocócica, a anfotericina B foi a mais usada (73,4%). Na literatura americana consultada, a associação anfotericina B + 5-fluorocitosina é mais vantajosa no que diz respeito a eficácia (VAN DER HOST et al., 1995). No Brasil, no entanto, a anfotericina B isolada é a mais usada pela indisponibilidade da 5-fluorocitosina (CAMPOS et al., 1992). Desconhece-se a razão da utilização da associação anfotericina B com fluconazol, observada em sete (23,3%) dos pacientes, uma vez que essa modalidade de terapêutica combinada não é preconizada (MEYER, 1992).

A taxa de mortalidade nesta casuística foi de 53,3%, sendo que nove óbitos (56,2%) ocorreram nas duas primeiras semanas de tratamento. Dismukes (1993) encontrou em sua casuística taxa de mortalidade entre 15 a 30%. A alta taxa de mortalidade em nossa casuística pode ser explicada pela maior gravidade da doença, sugerida pelos altos títulos de antigenemia na maioria dos pacientes (1:10.000 $p < 0,0001$). Outro fator contribuinte foi a imunodepressão (número de linfócitos CD4 menor que 200cel/mm³ em 80% dos pacientes); sendo que esta correlação entre níveis de CD4 e susceptibilidade ao *Cryptococcus neoformans* já foi referida anteriormente. (HARRISON; KORNFIELD; LEVITZ, 1995). Finalmente, a monoterapia como tratamento inicial pode ter contribuído para maior mortalidade de nossos pacientes (CAMPOS et al., 1992).

A resposta nem sempre esperada ao tratamento da criptococose vem sendo justificada por autores como Levitz (1998), que comprovou *in vitro* o estímulo da replicação do vírus HIV pelo *Cryptococcus neoformans* em macrófagos infectados, sugerindo a diminuição da morbidade e mortalidade

pelo vírus HIV com o tratamento precoce da criptococose. Sabe-se também que apenas a terapia anticriptocócica, na ausência de um número adequado de linfócitos CD4 a nível de SNC, não é suficiente para controlar a infecção (HILL; AGUIRRE, 1993).

Em nossa casuística, dos seis pacientes com número de linfócitos CD4 maior que 200cel/mm³, dois tinham AIDS, dois eram usuários de corticóide por longa data e dois não tinham doença imunológica aparente. Com exceção do paciente 13 - com meningite criptocócica por var. *gattii* (comum em imunocompetentes) - os demais tiveram uma infecção oportunística mesmo com nível normal de linfócitos CD4. Horn e Washburn (1995) justificam parcialmente esta situação em seu experimento *in vitro* e *in vivo*, no qual verificaram que níveis baixos de interleucina -2 contribuem para uma deficiente função das células NK implicadas na destruição do *Cryptococcus neoformans*, mesmo em presença de níveis normais de linfócitos CD4.

O presente experimento foi motivado por relatos da literatura que sugerem uma relação direta entre o diâmetro da cápsula do *Cryptococcus neoformans* e a imunidade do hospedeiro. Tendo como principal objetivo comprovar ou não esta relação, iniciamos nosso trabalho.

Edward Bottone e colaboradores (1986) escreveram um artigo sugerindo que *Cryptococcus neoformans* com cápsulas pequenas causavam doença em pacientes com AIDS e, com cápsulas grandes, em pacientes sem AIDS. Acreditavam que o diâmetro da cápsula tinha uma relação direta com a imunidade do paciente.

Edward Bottone e Gary P. Wormser (1986) publicaram um novo estudo comprovando que, em cinco dos sete pacientes estudados, a cápsula do *Cryptococcus neoformans*, observada em LCR de paciente com AIDS inicialmente apresentava um diâmetro reduzido, aumentando quando a levedura era inoculada em animais de experimentação sem deficiência imunológica.

Em nosso estudo clínico, empregamos duas metodologias distintas para avaliar a relação entre imunidade celular do hospedeiro e diâmetro da cápsula de *Cryptococcus neoformans*: a relação entre diâmetro da cápsula e da levedura, e o volume e a superfície da cápsula. O emprego do método morfométrico que analisa volume e superfície está mais próximo da realidade por ser a levedura de *Cryptococcus neoformans* uma estrutura esferóide (KOZEL et al., 1996).

O número de linfócitos CD4 apresentado pelos pacientes do nosso estudo, por ocasião do diagnóstico da criptococose, foi o indicativo da imunidade celular, como sugeriu Mody et al.(1990); e a esse foi comparada a morfometria da cápsula do *Cryptococcus neoformans*.

Não houve significância estatística que comprovasse a relação direta entre o diâmetro da cápsula e a imunidade do hospedeiro sugerida nos trabalhos de Edward Bottone e colaboradores (1986) e Edward Bottone e Gary P. Wormser (1986).

A síntese da cápsula do *Cryptococcus neoformans* ocorre no pulmão do hospedeiro a nível de alvéolo. Quando o basidiosporo, por inalação, atinge o alvéolo pulmonar, à presença de temperatura de 37 graus centígrados e boas condições ambientais, inicia sua reprodução assexuada formando leveduras que rapidamente se tornam encapsuladas. A presença da cápsula é determinada

geneticamente e seu diâmetro é variável (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). Não existe comprovação de quais seriam os fatores externos que determinariam o diâmetro da cápsula. Sabe-se apenas que a sua formação se dá por duas razões: o próprio fungo produz o polissacarídeo que vai compor a cápsula e a ligação desse material à superfície da levedura ocorre pela presença de prováveis receptores existentes a este nível, os quais receberão o material capsular até ficarem saturados. O *Cryptococcus neoformans* acapsular possui estes receptores mas não tem capacidade de produzir o polissacarídeo capsular. Sendo assim, quando se oferta a estas leveduras apenas o polissacarídeo, elas podem se tornar capsuladas (KOZEL; HEMERATH, 1984).

Dependendo do diâmetro da cápsula formada neste ambiente, será a maior dificuldade dos macrófagos alveolares do hospedeiro em fagocitar a levedura e, assim, apresentar os antígenos ao sistema imunológico (VECCHIARELLI et al., 1994). Quanto maior a cápsula, menor o estímulo ao sistema imunológico do hospedeiro em produzir linfócitos T e maior a virulência do *Cryptococcus neoformans* (COLLINS; BANCROFT, 1991 e MODY; SYME, 1993).

A proliferação de linfócitos CD4 inibida pelo *Cryptococcus neoformans* é o fato mais importante no mecanismo de defesa do hospedeiro contra o fungo. Além do linfócito CD4 ser responsável pela estimulação de macrófagos e células citotóxicas através da produção de interleucina -2 e IFN- γ , as quais tem efeito anticriptocócico, o próprio linfócito CD4 pode ter atividade direta contra o *Cryptococcus neoformans* (SYME et al., 1997).

Observa-se que o diâmetro da cápsula do *Cryptococcus neoformans* influencia o nível de linfócitos CD4 do hospedeiro mas não foram comprovados quais os fatores, além do genético, que determinam o diâmetro da cápsula.

Provavelmente Edward e colaboradores (1986) estavam certos ao sugerirem que existe uma relação entre o diâmetro da cápsula e a imunidade do hospedeiro mas erraram ao sugerir que esta relação seria diretamente proporcional e que a imunidade influenciava o diâmetro da cápsula. O que parece ocorrer é que o diâmetro da cápsula exerce influência sobre a imunidade.

Estudos experimentais podem melhor elucidar se outros fatores não genéticos estão envolvidos na formação e crescimento da cápsula do *Cryptococcus neoformans*.

7 CONCLUSÕES

- 1 A incidência da criptococose entre os pacientes com AIDS vem diminuindo nos últimos dois anos. Esta observação correlaciona-se com a instituição da poliquimioterapia antiretroviral nesses pacientes;

- 2 Não existe relação estatisticamente significativa entre a morfometria da cápsula do *Cryptococcus neoformans* e o número de linfócitos CD4 nos pacientes estudados.

- 3 O perfil clínico do grupo de pacientes estudados foi: imunodepressão severa, neurocriptococose grave (sugerida pelos valores sorológicos) e alta taxa de mortalidade.

ANEXO 1

Protocolo de Criptococose

Número: _____ RG: _____ Data: _____

Nome: _____ Idade: _____

Sexo: _____ Profissão: _____ Procedência: _____

Doença de Base: _____

Forma Clínica: _____

Exames Laboratoriais:

Líquor:	Resultado		Resultado		Resultado
Aspecto		Hemáceas		CD4	
Pandy		Leucócitos		CD8	
Proteína		Linfócitos		CD4/CD8	
Glicose		Neutrófilos			
		Monócitos			
Células		Eosinófilos			
Micológico direto		Cultura			
		CGB			
Antígeno LCR					
Antígeno soro					
Diâmetro da cápsula		Cápsula/levedura			
Diâmetro da levedura					

Tratamento: Ataque: _____

Manutenção: _____

Evolução: _____

ANEXO 2

Características epidemiológicas da amostra estudada

Nº	Data	Nome	Idade	Sexo	Profissão	Procedência	Doença de base	Hospital de origem
1	09/07/97	N.R.B	48	M	Agente imobiliário	Joinville	AIDS	HOC
2	14/07/97	A.C.B	27	F	Não tem	Curitiba	AIDS	HC
3	16/07/97	R.F.C.	31	M	Contador	Umuarama	AIDS	HOC
4	19/08/97	M.S.	30	M	Chapeiro	Curitiba	AIDS	HC
5	29/09/97	P.C.C.	25	M	Pedreiro	Curitiba	AIDS	HC
6	26/10/97	A.F.S.	39	M	Não tem	Vitória da Conquista	AIDS	HOC
7	11/12/97	V.L.M.	40	F	Do lar	Araucária	LES	HC
8	17/12/97	O.L.H.	39	M	Repres. Comercial	Curitiba	AIDS	HEC
9	23/12/97	I.K.	32	F	Do lar	Curitiba	AIDS	HEC
10	05/01/98	B.T.C.	36	M	Motorista	Rio Branco do Sul	Transplantado renal	HC
11	06/01/98	J.L.F.	24	M	Repórter	Curitiba	AIDS	HEC
12	26/01/98	R.S.	24	M	Mão tem	Curitiba	AIDS	HC
13	04/02/98	A.P.S.	49	M	Madeireiro	Curitiba	Hígido	HOC
14	10/02/98	L.M.C.	32	M	Não tem	Telêmaco Borba	AIDS	HOC
15	20/03/98	L.F.L.	39	F	Do lar	Curitiba	AIDS*	HC
16	06/04/98	C.S.S.	31	M	Pedreiro	Castro	AIDS	HC
17	28/04/98	P.J.S.	47	M	Pedreiro	Curitiba	AIDS	HT
18	30/04/98	J.M.V.F.	36	M	Funileiro	São José dos Pinhais	AIDS	HC
19	08/05/98	M.J.P.	32	M	Zelador	Mafra	AIDS	HC
20	15/05/98	L.B.M.F.	42	M	Vendedor	São Paulo	AIDS	HC
21	23/05/98	L.R.S.	47	F	Do lar	São José dos Pinhais	Hígida	HC
22	17/06/98	M.D.S.	32	M	Não tem	Curitiba	AIDS	HC
23	10/07/98	M.Q.S.	29	M	Montador	Curitiba	AIDS	HEC
24	14/07/98	M.S.M.	37	F	Do lar	Curitiba	AIDS*	HC
25	15/09/98	C.S.	28	M	Aux. Serv. Gerais	Curitiba	AIDS	HOC
26	26/10/98	L.C.S.M.	27	M	Marceneiro	Mandirituba	AIDS*	HC
27	27/10/98	D.M.	30	M	Aux. Serv. Gerais	Curitiba	AIDS	HC
28	03/11/98	R.D.S.	30	F	Do lar	Curitiba	AIDS*	HC
29	03/11/98	J.L.G	29	M	Manobrista	Curitiba	AIDS	HC
30	04/11/98	S.R.N	26	M	Comerciante	Curitiba	AIDS	HC

* Primeira Manifestação da Doença

ANEXO 3

TABELA 3: Provas bioquímicas e meios seletivos usados na identificação do *Cryptococcus neoformans* e de suas variedades, realizadas em 30 amostras de LCR:

Nº	Des-tro-se	Mal-tose	Sa-ca-ro-se	Lac-tose	Ga-lac-tose	Me-labl-ose	Ce-lulo-se	Ino-sitol	Xilo-se	Rafi-nose	Tre-alo-se	Dul-citol	Ure-ase	Cres-ci-men-to a 37º	Ni-ger *	CG B**
1	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
2	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
3	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
4	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
5	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
6	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
7	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
8	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
9	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
10	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
11	+	+	+	-	+	-	S/D	+	+	-	+	+	+	+	+	-
12	+	+	+	-	+	-	S/D	+	+	-	-	+	+	+	+	-
13	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	-	+	-	S/D	+	+	+	+	+	+	+	+	-
15	+	+	+	-	+	-	S/D	+	+	+	+	+	+	+	+	-
16	+	+	+	-	+	-	S/D	+	-	-	-	+	+	+	+	-
17	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
18	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
19	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
20	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
21	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
22	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
23	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
24	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	+	+	+	-
25	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
26	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
27	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
28	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
29	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
30	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-

+= positivo
 -= negativo
 S/D = sem disco para realizar o teste
 AI = amostra inviável para realizar o teste
 * = colônias castanhas em ágar niger
 ** = torna azul o meio CGB

ANEXO 4

Características clínicas e laboratoriais da amostra estudada

Nº	CD4	Látex no soro	CGB	Medicação	Forma clínica	Evolução
1	2	1:10000	Neg	Anfotericina B + Fluconazol	Meningite	Óbito em 04/08/97 (26 dias)
2	220	1:10000	Neg	Anfotericina B + Fluconazol	Meningite	Alta para tratamento ambulatorial
3	8	1:10000	Neg	Anfotericina B + Fluconazol	Meningite	Alta a pedido
4	8	1/1024	Neg	Anfotericina B	Meningite	Óbito em 03/09/97 (15 dias)
5	7	1:10000	Neg	Anfotericina B	Meningite	Evasão hospitalar
6	10	1:10000	Neg	Anfotericina B + Fluconazol	Meningite	Óbito em 30/10/97 (4 dias)
7	640	1:1000	Neg	Anfotericina B	Meningite	Óbito em 03/01/98 (23 dias)
8	60	1:10000	Neg	Anfotericina B	Meningite	Alta para tratamento ambulatorial
9	68	1:10000	Neg	Anfotericina B	Meningite	Óbito em 27/12/97 (4 dias)
10	554	1:1000	Neg	Anfotericina B	Meningite	Óbito em 08/03/98 (63 dias)
11	10	1:10000	Neg	Não fez	Meningite	Óbito em 07/01/98 (1 dia)
12	48	1:1000	Neg	Anfotericina B	Meningite	Óbito em 28/01/98 (2 dias)
13	571	1:10000	Pos	Anfotericina B	Meningite	Alta com tratamento ambulatorial
14	46	1:10000	Neg	Anfotericina B	Meningite	Alta com tratamento ambulatorial
15	26	1:10000	Neg	Anfotericina B	Meningite	Óbito em 10/04/98 (21 dias)
16	1231	1:100	Neg	Anfotericina B	Meningite	Alta com tratamento ambulatorial
17	38	1:1000	Neg	Anfotericina B	Meningite	Óbito em 30/08/98 (124 dias)
18	26	1:10000	Neg	Anfotericina B	Meningite	Alta com tratamento ambulatorial
19	9	1:10000	Neg	Anfotericina B	Meningite	Óbito em 25/05/98 (17 dias)
20	13	1:10000	Neg	Anfotericina B	Meningite	Alta com tratamento ambulatorial
21	468	1:10000	Neg	Anfotericina B	Meningoencefalite	Óbito em 31/05/98 (8 dias)
22	23	1:10000	Neg	Anfotericina B	Meningite	Óbito em 18/06/98 (1 dia)
23	14	1:10000	Neg	Anfotericina B	Meningite	Óbito em 16/07/98 (6 dias)
24	22	1:10000	Neg	Anfotericina B	Meningite	Alta com tratamento ambulatorial
25	65	1:10000	Neg	Anfotericina B	Meningite	Evasão hospitalar
26	10	1:10000	Neg	Anfotericina B + Fluconazol	Meningite	Óbito em 28/10/98 (2 dias)
27	51	NR	Neg	Anfotericina B + Fluconazol	Meningite	Alta com tratamento ambulatorial
28	16	1:10	Neg	Anfotericina B	Meningite	Alta com tratamento ambulatorial
29	32	1:1000	Neg	Anfotericina B + Fluconazol	Meningite	Alta com tratamento ambulatorial
30	12	1:100	Neg	Anfotericina B	Meningite	Óbito em 30/11/98 (27 dias)

NR= não realizado

ANEXO 5

Características líquóricas das amostras estudadas

n°	Látex no líquor	Celularidade de (cel/mm ³)	Percentual de Linfócitos	Proteínas (em mg/dl)	Glicose (em mg/dl)	Relação cápsula/Levedura	Diâmetro da cápsula (em μ)	Superfície da Cápsula (em μ^2)	Volume da Cápsula (em μ^3)
1	1:10000	12	100%	29	46	2,46	14,03	341,19	3634,94
2	1:10000	83,7	100%	384	28	2,22	7,33	118,55	818,33
3	1:10000	106	100%	136	30	2,62	9,97	185,36	1384,28
4	1:1000	37,5	100%	65	53	2,77	10,11	178,75	1252,44
5	1:10000	7,6	100%	49	55	2,27	9,59	195,98	1552,71
6	1:10000	5	NR	62	17	2,13	8,01	146,19	1051,22
7	1:100	10	75%	175	25	2,60	7,95	118,96	730,93
8	1:10000	256	48%	134	26	2,83	11,06	199,40	1493,63
9	1:10000	850	60%	142	140	2,80	14,10	153,78	1116,24
10	1:1000	82	56%	72	111	1,58	5,03	149,29	1843,93
11	1:10000	NR	NR	NR	NR	3,26	12,86	252,65	2224,47
12	1:1000	0,3	NR	23	32	2,57	8,95	162,34	996,36
13	1:100	66	39%	55	25	3,19	17,88	512,67	5879,51
14	1:1000	16	100%	94	NR	2,83	14,66	426,79	5717,26
15	1:10000	5	57%	51	50	2,20	6,26	86,82	462,47
16	1:1000	2,3	NR	192	19	2,02	9,42	152,99	999,73
17	1:100	2,6	NR	87	49	2,67	8,46	138,58	961,25
18	1:10000	24	100%	63,2	38	2,49	9,01	165,55	1321,22
19	1:10000	115	13%	213	11	2,13	5,06	56,54	252,99
20	1:10000	35	16%	179	10	2,70	7,79	114,53	717,46
21	1:10000	10	14%	64	25	2,87	9,56	147,64	1091,16
22	1:10000	3	NR	51	53	2,51	9,78	182,53	1321,97
23	1:1000	NR	NR	NR	NR	2,59	9,04	152,31	986,76
24	1:10000	43	98%	99,7	48	2,19	6,76	100,18	587,69
25	NR	15	68%	40	50	2,70	6,33	136,39	881,64
26	1:10000	3,1	NR	NR	51	2,61	8,83	79,91	449,54
27	1:100	100	30%	142	31	2,14	10,23	132,51	934,33
28	NR	300	70%	119	62	2,75	6,86	181,38	1267,06
29	NR	4	50%	44,6	42	3,74	8,31	122,70	719,46
30	NR	0,6	NR	45	40	2,07	7,26	109,48	779,89

NR= não realizado

ANEXO 6

Distribuição de casos de AIDS segundo ano de diagnóstico, faixa etária e razão por sexo no período 1994 a 1998 no estado do Paraná.

Ano de Diagnóstico	Menores de 13 anos			13 a 49 anos			Maiores de 50 anos			Totais		
	M	F	M/F	M	F	M/F	M	F	M/F	M	F	M/F
1994	8	8	1/1	447	146	3/1	28	3	9/1	483	157	3/1
1995	14	18	1/1	517	196	3/1	36	17	2/1	567	231	3/1
1996	25	25	1/1	564	231	2/1	55	16	3/1	644	272	2/1
1997	23	17	1/1	624	274	2/1	70	20	4/1	717	311	2/1
1998	18	15	1/1	439	196	2/1	50	16	3/1	507	227	2/1

M= Masculino

F= Feminino

M/F= Relação masculino/feminino

ANEXO 7

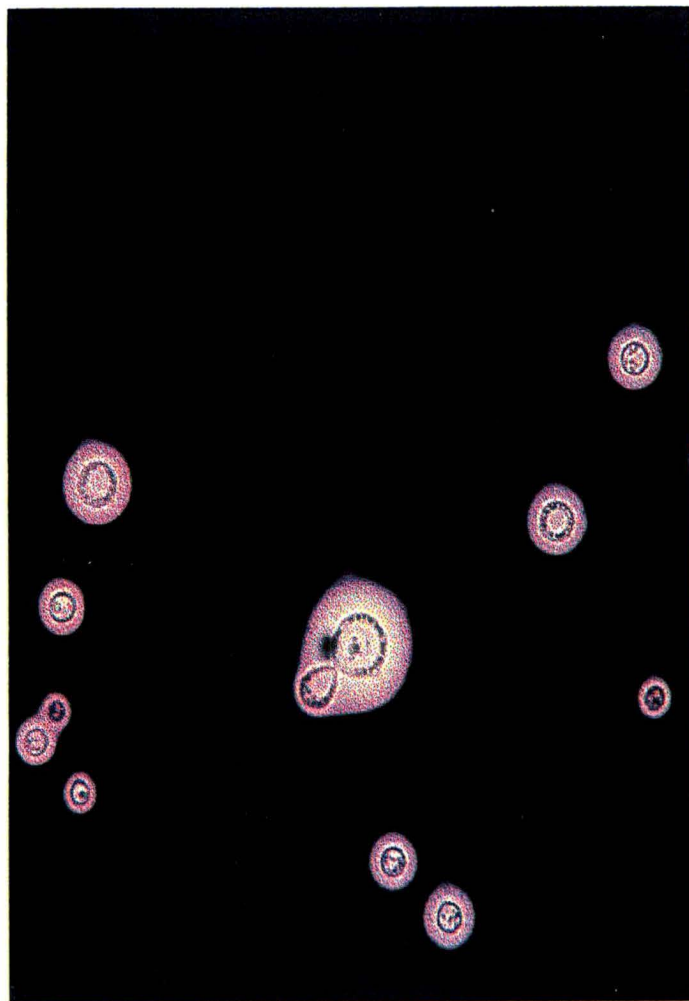
Total de casos de AIDS com criptococose extra pulmonar associada, segundo ano do diagnóstico no Brasil no período de 1994 a 1998*.

Ano do diagnóstico	Total de casos	Casos com criptococose extra-pulmonar	Percentual (%)
1994	17540	794	4,5
1995	18383	739	4
1996	19222	734	3,8
1997	17187	512	3
1998	7564	177	2,3

* Dados preliminares do Ministério da Saúde em 28/11/98.

ANEXO 8

Imagem do *Cryptococcus neoformans* corado com tinta nanquim com aumento de 400 vezes



ANEXO 9

Relação entre a morfometria da cápsula do *Cryptococcus neoformans* e os níveis de CD4 dos pacientes estudados:

Número	CD4	Relação cápsula/levedura	Diâmetro da cápsula (em μ)	Superfície da cápsula (em μ^2)	Volume da cápsula (em μ^3)
1	2	2,46	14,03	341,19	3634,94
2	220	2,22	7,33	1118,55	818,33
3	8	2,62	9,97	185,36	1384,28
4	8	2,77	10,11	178,75	1252,44
5	7	2,27	9,59	195,98	1552,71
6	10	2,13	8,01	146,19	1051,22
7	640	2,60	7,95	118,96	730,93
8	60	2,83	11,06	199,44	1493,63
9	68	2,80	14,10	153,78	1116,24
10	554	1,58	5,03	149,29	1843,93
11	10	3,26	12,86	252,65	2224,47
12	48	2,57	8,95	162,34	996,36
13	571	3,19	17,88	512,67	5879,51
14	46	2,83	14,66	426,79	5717,26
15	26	2,20	6,26	86,82	462,47
16	1231	2,02	9,42	152,99	999,73
17	38	2,67	8,46	138,58	961,25
18	26	2,49	9,01	165,55	1321,22
19	9	2,13	5,06	56,54	252,99
20	13	2,70	7,79	114,53	717,46
21	468	2,87	9,56	147,64	1091,16
22	23	2,51	9,78	182,53	1321,97
23	14	2,59	9,04	152,31	986,76
24	22	2,19	6,76	100,18	587,69
25	65	2,70	6,33	136,39	881,64
26	10	2,61	8,83	79,91	449,54
27	51	2,14	10,23	132,51	934,33
28	16	2,75	6,86	181,38	1267,06
29	32	3,74	8,31	122,70	719,46
30	12	2,07	7,26	109,48	779,89

ANEXO 10

**Autorização expedida pela Comissão de Ética do Hospital de Clínicas da UFPR
para realização do estudo.**

Curitiba, 14 de agosto de 1997.

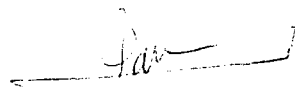
Ilmo(a) Sr.(a).
Dra. Leda Maria Rabelo
Departamento de Clínica Médica
Nesta

Prezado (a) Senhor (a):

Informo que o projeto "**Estudos morfométricos da cápsula e sua relação com a imunidade celular**" foi aprovado em reunião do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, no dia 29/07/97.

Sendo o que se apresenta para o momento, subscrevo-me,

Atenciosamente



Prof. Renato Tambara Filho
Presidente da Comissão de Ética Médica e do Comitê de
Ética em Pesquisa em Seres Humanos HC-UFPR

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 BAIRD, R. W.; FRACP, A. S. G.; GARFIELD, A. S. Cavitation and Rupture of a Pulmonary Cryptococcoma in an Immunocompetent Man. **The American Journal of Medicine**, v. 97, p. 309-311, Sept. 1994.
- 2 BENHAM, R. W. Cryptococci __ Their Identification by Morphology and by Serology. **Journal Infection Diseases**, v.57, p. 255-274, 1935.
- 3 BENNETT, J. E.; KWON-CHUNG, K. J.; HOWARD, D. H. Epidemiologic Differences Among Serotypes of *Cryptococcus neoformans*. **American Journal of Epidemiology**, v. 105, n. 6, p. 582-586, Jan. 1977.
- 4 BHATTACHARJEE, A. K.; BENNETT, J. E.; GLAUDEMANS, C. P. J. Capsular Polysaccharides of *Cryptococcus neoformans*. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 6, n. 5, p. 619-624, Sept. 1984.
- 5 BORDIGNON, G. P. F. **Quimiotipagem das Variedades de *Cryptococcus neoformans*** Curitiba, 1994. Monografia (Pós-Graduação em Bacteriologia Clínica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- 6 BOTTONE, E. J. et al. Poorly Encapsulated *Cryptococcus neoformans* from Patients with Aids. I: Preliminary observations. **Aids Research**, v. 2, n. 3, p. 211-218, 1986.
- 7 BOTTONE, E. J.; WORMSER, G. P. Poorly Encapsulated *Cryptococcus neoformans* from Patients with Aids. II. Correlation of Capsule size Observed Directly in Cerebrospinal Fluid with that After Animal passage. **Aids Research**, v. 2, n 3, p. 219-225, 1986.
- 8 BUCHANAN, K. L.; FIDEL, P. L.; MURPHY, J. W. Effects of *Cryptococcus neoformans*-Specific Suppressor T Cells on the Amplified Anticryptococcal Delayed-Type Hypersensitivity Response. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 1, p. 29-35, Jan. 1991.
- 9 CAMPOS, P. E. Et al. Estudo Retrospectivo Terapêutico da Neurocriptococose em 112 Aidéticos ou não. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 25, n. 4, p. 241-246, out-dez. 1992.
- 10 CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Isolation of the Third Capsule Associated Gene, CAP60, Required for Virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 66, n.5, p. 2230-2236, May 1998.
- 11 CHEN, S. C. A. et al. Identification by Polymorphic DNA of a Common Molecular Type of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in Patients with AIDS or Other Immunosuppressive Conditions. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 173, p. 754-758, 1996.
- 12 CHUCK, S. L.; SANDE, M. A. Infections with *Cryptococcus neoformans* in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v. 321, n. 12, p. 794-799, Sept. 1989.

- 13 COLLINS, H. L.; BANCROFT, G. J. Encapsulation of *Cryptococcus neoformans* Impairs antigen-Specific T-Cell Responses. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 11, p. 3883-3888, Nov. 1991.
- 14 COLOMBO, A. L. et al. Perfil de sensibilidade in vitro a antifúngicos de amostras de *Cryptococcus neoformans* de origem humana e ambiental. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 32, s. I, p.200-201, 1999.
- 15 DIAMOND, D. R.; BENNETT, J. E. Prognostic Factors in Cryptococcal Meningitis. **Annals of Internal Medicine**, v. 80, n. 2, p. 176-181, Feb. 1974.
- 16 DISMUKES, W. E. Cryptococcal Meningitis in Patients with AIDS. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 157, n. 4, p. 624-628, Apr. 1988.
- 17 DISMUKES, W. E. Management of Cryptococcosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 507-512, 1993.
- 18 DROMER, F. et al. Individual and Environmental Factors Associated with Infection Due to *Cryptococcus neoformans* Serotype D. **Clinical Infectious Diseases**, v. 23, p. 91-96, 1996.
- 19 DUSWALD, K. H.; PENK, A. ; PITTROW, L. High-dose therapy with fluconazole ≥ 800 mg day. **Mycoses**, v. 40, p. 267-277, 1997.
- 20 ELLIS, D. H.; PFEIFER, T. J. Natural Habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 7, p. 1642-1644, Mar. 1990.
- 21 EVANS, E. E.; KESSEL, J.F. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*: II. Serologic studies with the capsular polysaccharide. **J. Immunol**, v.67, p. 109-114, 1950.
- 22 GABUZDA, D. H.; HIRSCH, M. S. Neurologic Manifestations of Infection with Human Immunodeficiency Virus. **Annals of Internal Medicine**, v. 107, p.383-391, 1987.
- 23 GIORGI, J. V. et al. Quality Control in the Flow Cytometric Measurement os T lymphocyte Subsets: The Multicenter AIDS Cohort Study Experience. **Clin. Immunol. Immunopathol**, v. 55, p. 173-186, 1990.
- 24 GRAYBILL, J. R. Cryptococcal Meningitis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 60-67, 1997.
- 25 HAJJEH, R. A.; BRANDT, M. E.; PINNER, R. W. Emergence of Cryptococcal Disease: Epidemiologic Perspectives 100 Years after Its Discovery. **Epidemiologic Reviews**, v. 17, n. 2, p. 303-320, 1995.
- 26 HARRISON, T. S.; KORNFELD, H.; LEVITZ, S. M. The Effect of Infection with Human Immunodeficiency Virus on the Anticryptococcal Activity of lymphocytes and Monocytes. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 172, p. 665-671, 1995.
- 27 HILL, J. O.; AGUIRRE, K. M. CD4+ T Cell-Dependent Acquired State of Immunity That Protects the Brain Against *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Immunology**, v. 152, p. 2344-2350, 1994.

- 28 HORN, C. A.; WASHBURN, R. G. Anticryptococcal Activity of NK Cell Enriched Peripheral Blood Lymphocytes from Human Immunodeficiency Virus - Infected Subjects: Responses to Interleukin-2, Interferon- γ , and Interleukin-12. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 172, p. 1023-1027, 1995.
- 29 JAMES, P. G.; CHERNIAK, R. Galactoxylomannans of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 3, p.1084-1088, Mar. 1992.
- 30 KAUFMAN, L.; REISS, E. Serodiagnosis os Fungal Diseases. In: ROSE, N. R. et al. **Manual of Clinical Laboratory Immunology**. 4rd.ed. Washington: America Society for Microbiology, 1992. p. 506-528.
- 31 KERSCHNER, J. E.; RIDLEY, M. B.; GREENE, J. N. Laryngeal Cryptococcus. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 121, p. 1193- 1195, Oct. 1995.
- 32 KOHL, K. H. et al. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Europe. **Lancet**, v. 29, p. 1515, June, 1985.
- 33 KOVACS, J. A. et al. Cryptococcosis in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. **Annals of Internal Medicine**, v. 103, n. 4, p. 533-538, Oct. 1985.
- 34 KOZEL, T. R. Et al. Influence of Opsonization Conditions on C3 Deposition and Phagocyte Binding of Large- and Small-Capsule *Cryptococcus neoformans* Cells. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 6, p. 2336-2338, June 1996.
- 35 KOZEL, T. R., HARMERATH, J. C. Binding os cryptococcal polysaccharide to *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 43, p. 574-579, 1984.
- 36 KWON-CHUNG, K. J. Cryptococcosis. In: KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. **Medical Mycology**. London: Lea & Febiger, 1992. p. 397-446.
- 37 KWON-CHUNG, K. J. A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. **Mycologia**, v. 67, p. 1197-1200, 1975.
- 38 KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E.; THEODORE, T. S. *Cryptococcus bacillisporus* sp. nov.: Serotype B-C of *Cryptococcus neoformans*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 28, n.4, p. 616- 620, Oct. 1978.
- 39 KWON-CHUNG, K. J.; POLACHECK, I.; BENNETT, J. E. Improved Diagnostic Medium for Separation of *Cryptococcus neoformans* var. *Neoformans* (Serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (Serotypes B and C). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 15 n. 3, p. 535-537, Mar. 1982.
- 40 KWON-CHUNG, K. J.; RHODES, J. C. Encapsulation and Melanin Formation as Indicators of Virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 51, n.1, p. 218-223, Jan. 1986.
- 41 LACAZ, C. S. Técnicas de Coloração. In: LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia Médica**. 8^o. ed. São Paulo: Sarvier, 1991. p. 547-548.
- 42 LARSEN, R. A. et al. Persistent *Cryptococcus neoformans* Infection of the Prostate after Successful Treatment of Meningitis. **Annals of Internal Medicine**, v. 111, n. 2, p. 125-128, July 1989.

- 43 LARSEN, R. A.; LEAL, M. A. E.; CHAN, L. S. Fluconazole Compared with Amphotericin B plus Flucytosine for Cryptococcal Meningitis in AIDS. **Annals of Internal Medicine**, v. 113, p. 183-187, 1990.
- 44 LAZERA, M. S. et al. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. **Journal of Medical & Veterinary Mycology**, v. 34, p. 127-131, 1996.
- 45 LAZERA, M. S.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M. M. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 31, p. 449-454, 1993.
- 46 LEVITZ, S. M.; FARRELL, T. P.; MAZIARZ, R. T. Killing of *Cryptococcus neoformans* by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Stimulated in Culture. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 163, p. 1108-1113, 1991.
- 47 LEVY, R. M.; BREDESEN, D. E.; ROSENBLUM, M. L. Neurological manifestations of the acquired immuno-deficiency syndrome (AIDS): Experience at UCSF and review of the literature. **J. Neurosurg**, v. 62, p. 475-495, April. 1985.
- 48 MABEE, C. L. et al. Cirrhosis: A Risk Factor for Cryptococcal Peritonitis. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 90, n. 11, Nov. 1995.
- 49 MATAS, S. L. A. **Comparação do LCR de pacientes com neurocriptococose sem AIDS e com AIDS.** São Paulo, 1992. Tese de Mestrado em Neurologia – Curso de Pós-Graduação do Departamento de Neurologia e Neurocirurgia. Escola Paulista de Medicina.
- 50 MEYER, R. D. Current Role of Therapy with Amphotericin B. **Clinical Infectious Diseases**, v. 14, p. 54-60, 1992.
- 51 MODY, C. H. Et al. Depletion of CD4+ (L3T4+) Lymphocytes in vivo Impairs Murine Host Defense to *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of Immunology**, v. 144, n. 4, p. 1472-1477, Feb. 1990.
- 52 MODY, C. H.; SYME, R. M. Effect of Polysaccharide Capsule and Methods of Preparation on Human Lymphocyte Proliferation in Response to *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 2, p. 464-469, Feb. 1993.
- 53 PALELLA, F. J. Jr. Et al. Declining Morbidity and Mortality Among Patients with Advanced Human Immunodeficiency Virus Infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 13, p.853-859, March. 1998.
- 54 POWDERLY, W. G. et al. Measurement of Cryptococcal Antigen in Serum and Cerebrospinal Fluid: Value in the Management of AIDS-Associated Cryptococcal Meningitis. **Clinical Infectious Diseases**, v.18, p. 789-792, May. 1994.
- 55 QUEIROZ-TELLES, F. Et al. **Criptococose disseminada por *Cryptococcus neoformans gattii*, com resposta favorável à terapêutica com Itraconazol. Relato de caso.** In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL (33: 1997 : Belo Horizonte).

- 56 SAAG, M. S. et al. Comparison of fluconazole (ELU) versus itraconazole (ITRA) as maintenance therapy of AIDS-associated cryptococcal meningitis (CM). (abstract). *ICAAC*, v. 35, p. I218, 1995.
- 57 SALKIN, I. F.; HURD, N. J. New Medium for Differentiation of *Cryptococcus neoformans* Serotype Pairs. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 15, n. 1, p. 169-171, Jan. 1982.
- 58 SORRELL, T. C. Et al. Natural Environmental Sources of *Cryptococcus neoformans* var. *Gattii*. *Journal Clinical Microbiology*, v. 34, n. 5, p.1261-1263, May. 1996.
- 59 SPEED, B.; DUNT, D. Clinical and Host Differences Between Infections with the Two Varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical Infectious Disease*, v. 21, p. 28-34, July 1995.
- 60 SUGAR, A. M.; STERN, J. J.; DUPONT, B. Overview: Treatment of Cryptococcal Meningitis. *Reviews of Infectious Diseases*, v. 12, s. 3, p. 338-348, March-April 1990.
- 61 SUS- PARANÁ. Boletim Epidemiológico da AIDS no Paraná. Fevereiro, 1999.
- 62 SYME, R. M.; et al. Both CD4+ and CD8+ human lymphocytes are activated and proliferate in response to *Cryptococcus neoformans*. *Immunology*, v. 92, p. 194-299, 1997.
- 63 RETINI, C. et al. Capsular Polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* Induces Proinflammatory Cytokine Release by Human Neutrophils. *Infection and Immunity*, v. 64, n. 8, p. 2897-2903, Aug. 1996.
- 64 ROZENBAUM, R.; GONÇALVES, A. J. R.; WANKE, B.; et al. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Brazilian AIDS patient. *Mycopathologia*, v. 112, p. 33-34, 1990.
- 65 RUIZ, A.; FROMTLING, A.; BULMER, G. S. Distribution of *Cryptococcus neoformans* in Natural Site. *Infection and Immunity*, v. 31, n. 2, p. 560-563, Feb. 1981.
- 66 TODARO-LUCK, F. et al. Characterization of *Cryptococcus neoformans* Capsular Glucuronoxylomannan Polysaccharide with Monoclonal Antibodies. *Infection and Immunity*, v. 57, n. 12, p. 3882-3887, Dec. 1989.
- 67 VANBREUSEGHM, R.; TAKASHIO, M. An Atypical Strain of *neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894. Part II. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* var. nov. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, v. 50, n. 6, p. 695-702, 1970.
- 68 VAN DER HORST, C. et al. Part I. Randomized double blind comparison of amphotericin B plus flucytosine (AMB+SFC) to AMB alone (step 1) folowed by a comparison of fluconazole to itraconazole (step 2) in the treatment of acute cryptococcal meningitis in patients with AIDS. (abstract). *ICAAC*, v. 35, p. I216, 1995.
- 69 VECCHIARELLI, A. et al. Encapsulation of *Cryptococcus neoformans* regulates fungicidal activity and the antigen presentation process in human alveolar macrophages. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 98, p. 217-223, 1994.

- 70 VECCHIARELLI, A. et al. Involvement of C3a and C5a in Interleukin-8 Secretion by Human Polymorphonuclear Cells in Response to Capsular Material of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 66, n.9, p. 4324-4330, Sept. 1998.
- 71 VECCHIARELLI, A. Et al. Purified Capsular Polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* Induces Interleukin-10 Secretion by Human Monocytes. **Infection and Immunity**, v. 64, n.7, p. 2846-2849, July 1996.
- 72 VERNA, L. C.; HERRERO, F. J. Medicion de los organismos. In: _____ **Micologia, Morfologia, Biologia Experimentacion: Sus aplicaciones a la Medicina y la Industria**. Buenos Aires: El Ateneo, 1952, p. 219-221.72
- 73 WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* Melanin and Virulence: Mechanism of Action. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 8, p. 3131-3136, Aug. 1995.
- 74 WILSON, D. E.; BENNETT, J. E.; BAILEY, J. W. Serologic Grouping of *Cryptococcus neoformans*. **Experiemntal Biology and Medice**, v.127, p. 820-823, 1968.
- 75 ZIMMER, B. L.; ROBERTS, G. D. Rapid Selective Urease Test for Presumptive Identification of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 380-381, Sept. 1979.