

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**

CAROLINE MIRANDA DE LIMA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E PERFIL DE
SUSCEPTIBILIDADE E VIRULÊNCIA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE
Cryptococcus spp.**

**Belo Horizonte
2019**

CAROLINE MIRANDA DE LIMA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E PERFIL DE
SUSCEPTIBILIDADE E VIRULÊNCIA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE
Cryptococcus spp.**

Dissertação de mestrado submetido ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do Título de Mestre em Microbiologia.

ORIENTADORA: PROF^a. DRA. SUSANA JOHANN

**Belo Horizonte
2019**




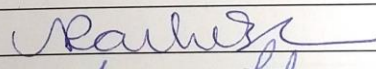
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

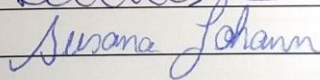
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

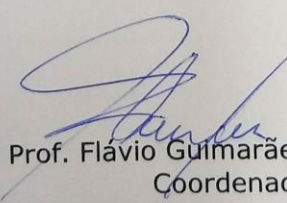
ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Caroline Miranda de Lima
Nº REGISTRO: 2017702450

Às 14:00 horas do dia 13 de Março de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Daniel de Assis Santos (UFMG) e Rachel Basques Caligiorne (Santa Casa) e o(a) Prof(a). Dra. Susana Johann - Orientador(a), para julgar o trabalho final "Caracterização molecular e perfil de susceptibilidade e virulência de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.", do(a) aluno(a) Caroline Miranda de Lima, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao(à) candidato(a), para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O(A) candidato(a) foi considerado(a) **APROVADO(A)**. O resultado final foi comunicado publicamente ao(à) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 13 de Março de 2019.

Dr(a). Daniel de Assis Santos 

Dr(a). Rachel Basques Caligiorne 

Prof(a). Susana Johann [Orientador(a)] 


Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador

043 Lima, Caroline Miranda de.
Caracterização molecular e perfil de susceptibilidade e virulência de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. [manuscrito] / Caroline Miranda de Lima. – 2019.

87 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Susana Johann.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. *Cryptococcus*. 3. Virulência. 4. Antifúngicos. I. Johann, Susana. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. II. Título.

CDU: 579

Dedico o presente trabalho:
aos meus pais Vilma e Élcio, meus grandes exemplos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar meus passos dando-me força, sabedoria e coragem para encarar meus medos e inseguranças.

Aos meus pais, Vilma e Élcio, por todo o carinho e dedicação incondicional, por serem pais maravilhosos que nunca mediram esforços para que eu pudesse conquistar meus objetivos. Agradeço ao meu irmão Guilherme, por sempre estar ao meu lado na torcida pelas minhas conquistas.

Ao Marco Paulo, por todo carinho e paciência que sempre demonstrou, mesmo nos momentos de angústia ou estresse. Gratidão por ser meu incentivador e por sempre me encorajar a ir em busca dos meus sonhos.

Agradeço também ao grupo dos Antifúngicos, Lana, Cristina, Aline, Lucrécia e Blenda, por todo o apoio não apenas nos ensaios, mas também na convivência diária. Agradeço em especial a minha orientadora Susana pela confiança em me receber desde a iniciação científica.

A todos os meus amigos e colegas do Lab Fungos que se tornaram muito mais que companheiros de laboratório ao longo desses seis anos de convivência. Agradeço em especial à Lívia, Babi, Katharina, Karina e Flávia que foram minhas cúmplices na rotina do laboratório, tornando essa trajetória mais alegre, leve e divertida.

Aos professores Carlos Rosa e Luiz Rosa pelos diversos ensinamentos, seja nos seminários ou no cotidiano.

A todos do Laboratório de Micologia, por me ajudarem todas as vezes que eu precisei, sempre com muita paciência.

A toda equipe do setor de Microbiologia dos hospitais colaboradores, especialmente a Vanessa, sempre muito atenciosa comigo. Agradeço também à equipe médica pela disponibilidade em participar desse estudo, em especial ao Dr. Leonardo e Dr. Shinfaya, por toda a ajuda na interpretação nos dados dos prontuários.

Aos meus amigos Biolindos, por me proporcionarem momentos de descontração e amizade, em especial aos meus amigos Débora, Gabi, Anderson e Renato por todo o companheirismo ao longo desses anos.

Por fim, agradeço a banca examinadora, Daniel, Rachel e Marliete por terem aceitado o convite em participar dessa importante etapa da minha vida acadêmica.

RESUMO

A criptococose é uma micose invasiva que é caracterizada por lesões nodulares nos pulmões, tecidos cutâneos e em casos mais graves pode se disseminar para o sistema nervoso central, causando a meningoencefalite. Essa infecção pode afetar indivíduos imunossuprimidos e imunocompetentes e apresenta alto índice de mortalidade em pacientes com AIDS. Diante disso, o presente estudo realizou a caracterização de 60 amostras clínicas provenientes dos hospitais Eduardo de Menezes e Santa Casa de Belo Horizonte. As amostras coletadas foram submetidas a identificação molecular e análise do perfil de susceptibilidade e virulência. Foram identificados 54 isolados como *C. neoformans* genótipo VNI, 4 isolados como *C. deuterogattii* genótipo VGII e apenas 2 isolados como *C. neoformans* genótipo VNII. Todos os isolados analisados produziram melanina e cresceram a 37°C e 39°C. Apenas três isolados não produziram fosfolipase e dois isolados não produziram proteinase. A análise da sobrevivência em modelo invertebrado de *Tenebrio molitor* demonstrou que 28 linhagens de *C. neoformans* VNI foram mais virulentas que o isolado controle H99, ou seja, mataram mais depressa as larvas após a infecção. A comparação dos isolados de *C. deuterogattii* revelou que 3 dos 4 isolados foram mais virulentos que a linhagem controle ATCC24065. Em relação ao perfil de susceptibilidade antifúngica, todas as amostras analisadas foram susceptíveis ao fluconazol, voriconazol e anfotericina B. Apenas 2 isolados de *C. deuterogattii* apresentaram resistência ao itraconazol. A correlação com os dados clínicos dos pacientes mostrou que a maior parte dos pacientes com criptococose eram indivíduos do sexo masculino, com média de idade de 41.1 anos. Além disso, o presente estudo revelou que grande parte dos pacientes com criptococose apresentavam alguma doença de base que ocasionava um quadro de imunossupressão. A maioria dos indivíduos apresentavam infecção pelo vírus HIV, mas também foram relatados casos de pacientes com diabetes, lúpus e câncer. É importante salientar que a taxa de mortalidade entre os pacientes com HIV foi considerada elevada, com um percentual de 29.8% de óbitos. Acrescenta-se ainda que as amostras analisadas foram provenientes de 16 cidades de Minas Gerais, abrangendo cidades do interior, região metropolitana e capital. Dessa forma, o presente estudo reforça a importância do estudo epidemiológico de isolados de *Cryptococcus*, a fim de se conhecer as espécies fúngicas circulantes, bem como avaliar o perfil dessas amostras quanto a virulência e susceptibilidade antifúngica, permitindo assim, um melhor manejo clínico do paciente.

Palavras-chave: *Cryptococcus*; Caracterização, Antifúngicos, Virulência

ABSTRACT

Cryptococcosis is an invasive mycosis that can affect pulmonary or cutaneous sites and, in more severe cases, can spread to the central nervous system, causing meningoencephalitis. This infection can affect immunosuppressed and immunocompetent individuals and presents a high mortality rate in patients with AIDS. Therefore, the present study carried the characterization of 60 clinical samples from the Eduardo de Menezes and Santa Casa hospitals in Belo Horizonte. The collected samples were submitted to molecular identification and analysis of susceptibility and virulence profile. We identified 54 isolates as *C. neoformans* genotype VNI, 4 isolates as *C. deuterogattii* genotype VGII and only 2 isolates as *C. neoformans* genotype VNII. All the isolates analyzed produced melanin and grew at 37 ° C and 39 ° C. Only three isolates did not produce phospholipase and two did not produce proteinase. Survival analysis in the *Tenebrio molitor* invertebrate model showed that 28 strains of *C. neoformans* VNI were more virulent than the H99 control isolate, that is, they killed the larvae more quickly after infection. Comparison of *C. deuterogattii* isolates revealed that 3 of the 4 isolates were more virulent than the ATCC24065 control strain. In relation to the antifungal susceptibility profile, all the samples analyzed were susceptible to fluconazole, voriconazole and amphotericin B. Only two isolates of *C. deuterogattii* presented resistance to itraconazole. The correlation with the clinical data of the patients showed that the majority of cryptococcosis patients were males, with a mean age of 41.1 years. In addition, the present study revealed that the majority of patients with cryptococcosis had some underlying disease that caused immunosuppression. Most individuals had HIV, but cases of patients with diabetes, lupus and cancer were also reported. The mortality rate among HIV patients was considered high, with a percentage of 29.8% of deaths. It is interesting to note that the analyzed samples came from 16 cities of Minas Gerais, covering cities in the interior, metropolitan region and capital. Thus, the present study reinforces the importance of the epidemiological study of isolates of *Cryptococcus*, in order to know the circulating fungal species, as well as to evaluate the profile of these samples in terms of virulence and antifungal susceptibility, thus allowing a better clinical management of the patient.

Keywords: *Cryptococcus*; Characterization, Antifungal, Virulence

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número de casos globais de meningite criptocócica relacionada a indivíduos com HIV. Fonte: Adaptado de Rajasingham e colaboradores (2017)	17
Figura 2 - Patogênese da meningoencefalite criptocócica. Células fúngicas transportadas pelo ar que são inaladas pelo hospedeiro e proliferam no pulmão, depois se disseminam por meio da corrente sanguínea para o cérebro. Fonte: Adaptado de KWON-CHUNG e colaboradores (2014).	19
Figura 3 - Disseminação de células fúngicas na barreira hematoencefálica (BHE). Fonte: Adaptado de May e colaboradores (2015).....	21
Figura 4 - Fatores de Virulência. A) Produção de melanina. B) Produção de urease (tubo 1 indica controle e tubo 2 indica isolado positivo). C) Produção de proteinase. Fonte: Lima, CM; 2019.	22
Figura 5 - Diferenciação de isolados de <i>Cryptococcus</i> em meio CGB. A) Não ocorreu alteração na coloração do meio, indicativo de <i>C. neoformans</i> . B) Mudança na coloração do meio, indicativo de <i>C. gattii</i> . Fonte: Lima, CM.; 2019	27
Figura 6 - Infecção em larvas de <i>Tenebrio molitor</i> . A) Inóculo foi injetado na hemocele na porção ventral. B) Observação de larva morta apresentando melanização característica. Fonte: LIMA, CM; 2019.....	44
Figura 7 - Curvas de sobrevivência de larvas de <i>Tenebrio molitor</i> em diferentes concentrações. A) Larvas infectadas com linhagem ATCC24065 nas concentrações 1×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 e 1×10^6 leveduras/larva. B) Larvas infectadas com a linhagem H99 nas concentrações 1×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 e 1×10^6 leveduras/larva.	51
Figura 8 - Curvas de sobrevivência de larvas de <i>Tenebrio molitor</i> . A) Isolados 1048, 51721, 31015, 1806, 1069, 50467, 2025, 307, 2925 e 57383. B) Isolados 1085, 540, 1865, 47873, 1045, 27951, 1265, 26283, 1870 e 53131. C) Isolados 2930, 3191, 36765, 1912, 291, 1746, 4892, 314, 4652 e 5197. D) Isolados 1742, 31104, 1716, 4578, 4886, 114, 390, 568, 350 e 818. E) Isolados 486, 452, 580, 909, 1820, 8950, 4662, 4371, 7533 e 5985. F).....	52
Figura 9 - Relação entre a faixa etária e sexo dos pacientes acometidos pela criptococose.	57
Figura 10 - Mapa de Minas Gerais mostrando a distribuição das amostras de <i>Cryptococcus</i> spp.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proposta recente para nova nomenclatura do complexo de espécies <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i>	15
Tabela 2 – Iniciadores/condições usadas na amplificação dos loci que foram sequenciados .	39
Tabela 3 - Código, sítio de origem e caracterização inicial das 60 amostras clínicas.....	46
Tabela 4 - Identificação dos isolados de <i>Cryptococcus</i> spp. pela técnica de PCR <i>fingerprint</i>	47
Tabela 5 - Identificação de alelos de <i>Cryptococcus</i> pelo sequenciamento multilocus (MLST).	48
Tabela 6 - Genes sequenciados com o total de alelos e alelos mais frequentes	49
Tabela 7 - Produção de proteinase e fosfolipase pelos isolados clínicos de <i>Cryptococcus</i> spp. separados por genótipos	50
Tabela 8 - Produção de Melanina pelos isolados clínicos de <i>Cryptococcus</i> spp. separados por genótipos.....	50
Tabela 9 – Média de sobrevivência dos isolados clínicos de <i>C. neoformans</i> mais virulentos em modelo de larva de <i>Tenebrio molitor</i>	53
Tabela 10 – Média de sobrevivência dos isolados clínicos de <i>C. deuterogattii</i> mais virulentos em modelo de larva de <i>Tenebrio molitor</i>	54
Tabela 11 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos isolados de <i>Cryptococcus</i> spp frente aos antifúngicos usuais	54
Tabela 12 – CIM ₅₀ e CIM ₉₀ dos isolados clínicos de <i>Cryptococcus</i> spp. frente aos antifúngicos usuais	56
Tabela 13 - Faixa etária dos pacientes com criptococose analisados no presente estudo	57
Tabela 14 - Frequência percentual de criptococose de acordo com as variáveis clínicas e sexo	58

LISTA DE ABREVIações

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AMB – Anfotericina B

ATCC – “American Type Culture Collection”

CGB – Canavanina-glicina- azul de bromotimol

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – “Clinical and Laboratory Standards Institute”

FLU – Fluconazol

GalXM – galactoxilomanana

GM – Grupo molecular

GMX – glucoronoxilomanana

HIV – Vírus da Imunodeficiência Adquirida

IRIS – Síndrome Inflamatória da Reconstituição Imune

ITC - Itraconazol

MLST – Tipagem por Sequenciamento Multilocus

MOPS – Tampão ácido morfolino propanosulfônico

µM – micrômetro

PCR – reação em cadeia da polimerase

PER – peroxidase

RAPD - DNA Polimórfico Amplificado Aleatoriamente

RFLP - Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição

SNC – Sistema nervoso central

SOD – superóxido dismutase

TAR – Terapia Antirretroviral

UFC – unidade formadora de colônia

Var – variedade

VOR – Voriconazol

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	16
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 O gênero <i>Cryptococcus</i> e sua classificação.....	11
1.2 Epidemiologia.....	16
1.3 Patogênese.....	19
1.4 Fatores de Virulência.....	22
1.5 Manifestações clínicas.....	25
1.6 Diagnóstico	26
1.7 Tratamento e Resistência aos Fármacos.....	29
2 JUSTIFICATIVA	32
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo Geral.....	33
3.2 Objetivos Específicos	33
4 METODOLOGIA.....	34
4.1 Origem dos isolados	34
4.2 Aspectos éticos.....	34
4.3 Caracterização laboratorial	35
4.3.1 Coleta de amostras.....	35
4.3.2 Processamento das amostras e criopreservação.....	35
4.3.3 Cultivo em ágar CGB (ágar canavanina-glicina-azul-de-bromotimol)	35
4.4 Identificação molecular	36
4.4.1 Extração do DNA total.....	36
4.4.2 Amplificação utilizando o iniciador (GTG) ₅	37
4.4.3 Amplificação utilizando os iniciadores ITS1 e NL4	37
4.4.4 Tipagem por sequenciamento multilocus (MLST).....	38
4.4.5 Purificação dos amplicons	39

4.4.6	<i>Reações de sequenciamento</i>	39
4.5	Avaliação dos fatores de virulência	40
4.5.1	<i>Produção de fosfolipase</i>	40
4.5.2	<i>Produção de Proteinase</i>	41
4.5.3	<i>Produção de urease</i>	41
4.5.4	<i>Produção de melanina</i>	42
4.5.5	<i>Termotolerância</i>	42
4.5.6	<i>Ensaio de sobrevivência em modelo invertebrado</i>	42
4.6	Determinação da Atividade Antifúngica	43
4.6.1	<i>Teste de microdiluição em caldo</i>	43
4.7	Caracterização Epidemiológica	44
4.8	Análise Estatística	45
5	RESULTADOS	46
5.1	Caracterização das amostras clínicas	46
5.2	Identificação molecular	47
5.3	Avaliação dos fatores de virulência	50
5.3.1	<i>Sobrevivência em tenébrios</i>	51
5.4	Susceptibilidade antifúngica	54
5.5	Caracterização epidemiológica	56
6	DISCUSSÃO	60
7	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	66
	ANEXO 1 – TERMO DE APROVAÇÃO	82
	ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	83
	ANEXO 3 - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TALE)	86

1 INTRODUÇÃO

A incidência de infecções fúngicas têm aumentado progressivamente devido aos avanços dos cuidados médicos nas populações de risco (ARMSTRONG-JAMES et al., 2014). Dentre os fatores de risco destacam-se o transplante de órgãos, doenças autoimunes, uso de quimioterápicos no tratamento de doenças neoplásicas, terapias com altas ou prolongadas doses de corticoides, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), pacientes idosos e indivíduos em unidades de terapia intensiva (BADIEE; HASHEMIZADEH, 2014). As micoses sistêmicas podem apresentar distintos padrões de incidência regional no mundo e suas características epidemiológicas podem ser diferentes de acordo com a região geográfica, condição socioeconômica, hábitos culturais e o número de condições individuais de risco (GIACOMAZZI et al., 2016; NUCCI et al., 2010).

Dentre as micoses invasivas que são frequentemente diagnosticadas, destaca-se aquelas causadas por espécies pertencentes aos gêneros *Candida*, *Aspergillus* e *Cryptococcus*. A criptococose é considerada a principal causa de meningoencefalite fúngica em todo o mundo, afetando indivíduos imunossuprimidos e imunocompetentes (SIFUENTES-OSORNIO et al., 2012). Acrescenta-se ainda que a meningite criptocócica é associada a uma elevada taxa de mortalidade, principalmente em indivíduos com o vírus HIV (ARMSTRONG-JAMES et al., 2014). A infecção por *Cryptococcus* pode ainda causar outras manifestações clínicas como fungemia, pneumonia, lesões em ossos, pele e tecidos moles (BADIEE; HASHEMIZADEH, 2014).

Apesar da disponibilidade de fármacos antifúngicos e terapia antirretroviral nos serviços de saúde do Brasil, a meningite criptocócica ainda representa a segunda infecção mais prevalente no sistema nervoso central (SNC) de pacientes com AIDS (MORA et al., 2012). Dessa forma, tendo em vista a alta taxa de mortalidade causada pela criptococose, o conhecimento epidemiológico é essencial para um pronto diagnóstico, bem como, para a indicação de procedimentos terapêuticos eficazes.

1.1 O gênero *Cryptococcus* e sua classificação

O gênero *Cryptococcus* é composto por leveduras capsuladas pertencentes à classe dos *Basidiomycetes*, que podem apresentar a capacidade de infectar uma grande variedade de hospedeiros, incluindo os mamíferos (MCMULLAN et al., 2013, PAPPALARDO; MELHEM, 2003). Essa doença caracteriza-se por manifestações clínicas pulmonares, cutâneas, oculares

podendo ainda, progredir para o quadro mais grave da doença, a meningoencefalite (ROSSI et al., 2016; NEGRONI, 2012).

A criptococose humana foi descrita pela primeira vez em 1894, quando Otto Busse e Abraham Buschke isolaram uma levedura capsulada de uma lesão na tíbia de uma mulher de 31 anos (MAY et al., 2015). Na década de 1980, com o surgimento da AIDS, a criptococose deixou de ser uma doença rara, tornando-se a quarta causa mais frequente de doenças infecciosas em indivíduos com AIDS com alto índice de mortalidade (ROSSI et al., 2016, SHIRLEY; BADDLEY, 2009; CASADEVAL; PERFECT, 1998). Além da AIDS, outros fatores colaboraram para o aumento dessa doença, como novas terapias imunossupressoras para o tratamento do câncer e de pacientes transplantados (MAY et al., 2015, IDNURM; LIN, 2015; DE JESUS et al., 2009).

Embora no passado os agentes etiológicos da criptococose tenham sido classificados como uma espécie anamórfica homogênea, sabe-se que estão divididos em dois complexos: *C. neoformans* e *C. gattii* (COGLIATI, 2013). As diferenças entre essas espécies incluem distribuição geográfica, nicho ecológico, morfologia de basidiósporos e susceptibilidade aos fármacos (CAMPBELL et al., 2015).

Apesar do ciclo assexuado ser prevalente, tanto *C. gattii* quanto *C. neoformans* apresentam ciclo sexual bipolar com dois tipos de cruzamento, mating-type a e α , sendo este último o mais prevalente em amostras clínicas e ambientais (COGLIATI, 2013). A fase teleomórfica do fungo foi classificada por Kwon-Chung como *Filobasidiella neoformans* e *Filobasidiella bacillispora* sendo os estados sexuais de *C. neoformans* e *C. gattii*, respectivamente (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). Além disso, durante a recombinação sexual, são produzidos diferentes basidiósporos. *F. neoformans* apresenta os basidiosporos esféricos, elípticos ou cilíndricos com paredes rugosas, enquanto que *F. bacillispora* são baciliformes e com parede lisa.

Salienta-se que o complexo *C. gattii* e *C. neoformans* apresentam cinco sorotipos definidos por antígenos capsulares: *C. neoformans* com os sorotipos A (var. *grubii*), D (var. *neoformans*), AD (híbrido entre os sorotipos var. *neoformans* e *C. gattii*) e o *C. gattii* com os sorotipos B e C (KWON-CHUNG et al., 2011). Em adição, alguns autores já relataram a presença dos subgrupos AI e AII, bem como o isolamento de híbridos interespecies como AB e BD (BOVERS et al., 2006). Contudo, frequentemente são observadas grandes divergências moleculares entre os sorotipos (ABEGG et al., 2006).

A partir do desenvolvimento e aprimoramento de técnicas moleculares, tornou-se possível a distinção entre os sorotipos e os tipos moleculares dessa levedura (SIDRIM et al.,

2010). As técnicas de tipagem molecular utilizam comumente o DNA genômico extraído da cultura de células da levedura. Os métodos moleculares incluem a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) *fingerprint* baseado em iniciadores específicos para microssatélites (M13) ou minissatélites (GACA)₄ ou (GTG)₅, DNA Polimórfico Amplificado Aleatoriamente (RAPD), Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP), Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos Amplificados (AFLP) e Tipagem por Sequenciamento Multilocus (MLST) (FENG et al., 2013; LEAL et al., 2008; FENG et al., 2008; BORMAN et al., 2008; LATOUCHE et al.; 2003).

A PCR *fingerprint* é considerada uma das técnicas mais rápidas para detectar padrões de bandas. Este método baseia-se na detecção de sequências repetitivas hipervariáveis do DNA (SIDRIM et al., 2010; RAMOS et al., 2008; MEYER et al., 1993). Meyer e colaboradores (1993) utilizaram a PCR *fingerprint* em um trabalho pioneiro para a tipagem de *Cryptococcus* spp., utilizando oligonucleotídeos iniciadores para amplificar sequências do DNA desses microorganismos. É importante ressaltar que a partir dessa técnica, tornou-se possível a classificação dos isolados de *Cryptococcus* em oito tipos moleculares. *C. neoformans* divide-se em VNI (sorotipo A), VNII (sorotipo A), VNIII (sorotipo AD) e VNIV (sorotipo D) (KWON-CHUNG et al., 2014). Em *C. gattii*, VGI e VGII geralmente correspondem ao sorotipo B, e VGIII e VGIV correspondem ao sorotipo C. Além disso, Ogundeji e colaboradores (2016) destacaram a importância da utilização da PCR em áreas com poucos recursos financeiros como na África. A PCR simples teria uma vantagem econômica entre as demais técnicas frequentemente utilizadas, uma vez que o custo por amostra seria menor em relação às outras técnicas (NYAZIKA et al., 2016; OGUNDEJI et al., 2016).

A técnica RAPD foi utilizada por mais de 10 anos para diferenciar os sorotipos de *Cryptococcus* (AOKI et al., 1999). O método baseia-se em iniciadores com sequências arbitrárias de nucleotídeos, e detectam polimorfismos sem uma informação específica sobre a sequência de nucleotídeos, funcionando como um marcador genético. Entretanto, esse método passou a ser substituído por técnicas que apresentam maior capacidade de diferenciar as bandas (SIDRIM et al., 2010). Entre esses outros métodos, destaca-se o uso da PCR-RFLP, AFLP e MLST (ARVANITIS et al., 2014; CHEN et al., 2014).

A PCR-RFLP pode ser utilizada em estudos de epidemiologia para determinar uma possível relação entre os isolados clínicos e ambientais, e pode utilizar como sequências alvo os genes URA5 e CAP59 (SIDRIM et al., 2010; MEYER et al., 2003). A técnica AFLP, em contrapartida, consiste na obtenção de um grande número de marcadores moleculares dentro dos genomas procarióticos e eucarióticos, além de representar outra alternativa para a tipagem

de espécies de *Cryptococcus*. (BOVERS et al., 2008). O AFLP é mais eficiente que a PCR-RFLP e RAPD pois combina alta especificidade, alta resolução e consiste em uma técnica que detecta presença ou ausência de polimorfismos em sítios de restrição (ILLNAIT-ZARAGOZI et al., 2010; LEAL et al., 2008). As principais limitações, entretanto, são o grande número de etapas, a demanda por muitos reagentes e a qualidade do DNA necessária para o sucesso dessa técnica (XU, 2006).

No início de 2007, diante da necessidade de uma padronização global das metodologias para a tipagem molecular de *Cryptococcus*, pesquisadores propuseram um esquema de genotipagem baseado em um consenso da Sociedade Internacional de Micoses Humanas e Animais (ISHAM) (MEYER et al., 2009). O MLST foi escolhido como o método padrão para a tipagem de linhagens criptocócicas devido a esta técnica apresentar um alto poder de discriminação entre as linhagens, bem como a sua reprodutibilidade em diferentes laboratórios. Estabeleceu-se ainda, oito linhagens referência representando os oito tipos moleculares dos agentes da criptococose (FENG et al., 2013; SIDRIM et al., 2010; MEYER et al., 2009).

O MLST foi desenvolvido inicialmente para bactérias, contudo, esta técnica posteriormente demonstrou alto poder discriminatório para um grande número de fungos patogênicos, tais como, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *Coccidioides* spp. e *Histoplasma capsulatum* (MAC-CANNELL et al., 2013; ALMEIDA; ARAUJO, 2013). O esquema de identificação por MLST baseia-se em um conjunto de sete locus genéticos, incluindo seis genes *housekeeping*, sendo estes CAP59, IGS1, GPD1, LAC1, PLB1, SOD1 e URA5. Destaca-se que três desses genes codificam importantes fatores de virulência para *Cryptococcus*: a cápsula polissacarídica (CAP59), síntese de melanina (LAC1) e invasão celular (PLB1) e o espaçador intergênico IGS1 que foi escolhido devido a sua alta diversidade alélica (MEYER et al., 2009). Beale e colaboradores (2015) compararam dados de genotipagem por MLST e fenotipagem *in vitro* e concluíram que as diferenças encontradas estavam associadas com a linhagem genética. Em outro estudo publicado por Cogliati e colaboradores (2016), o MLST foi utilizado para um grande número de isolados de diferentes fontes e origens geográficas, demonstrando ainda, a importância dessa técnica para a epidemiologia molecular.

A utilização do MLST tornou-se importante para a identificação de subtipos moleculares. Segundo Byrnes e colaboradores (2011), *C. gattii* incluiria os subtipos VGIIa, VGIIb, VGIIc, VGIIIa e VGIIIb. Em um estudo realizado por Chong e colaboradores (2010) observou-se que essas variações no genótipo são um fator importante na resposta *in vitro* de fármacos contra *Cryptococcus* spp. e devem ser levados em consideração na escolha do tratamento. Andrade-Silva (2018) também demonstraram a importância da utilização do MLST

para a identificação de isolados VNB que haviam sido previamente genotipados por PCR-RFLP como VNII. Com base nesses fatos, destaca-se a importância da genotipagem das espécies criptocócicas para a epidemiologia, bem como para o manejo clínico dos pacientes, especialmente no caso de genótipos altamente virulentos emergentes, uma vez que é possível notar diferenças com relação a susceptibilidade antifúngica (FIRACATIVE et al., 2012; IQBAL et al., 2010). O MLST, contudo, ainda é considerado um método caro e trabalhoso, uma vez que demanda várias etapas e iniciadores diferentes (OGUNDEJI et al., 2016; ILLNAIT-ZAGAROZI et al., 2010).

Diante da considerável heterogeneidade genética demonstrada pelos diversos métodos moleculares acima mencionados, Hagen e colaboradores (2015) propuseram uma nova classificação taxonômica das espécies criptocócicas patogênicas, levando-se em conta critérios genéticos e moleculares melhor definidos. De acordo com esta nova proposta, haveria a divisão em 7 espécies, incluindo 4 híbridos, sendo estes: *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) com três genótipos (VNI, VNII, VNB), *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D ou VNIV); e 5 outras espécies crípticas: *C. gattii*, *C. bacillisporus*, *C. deuterogattii*, *C. tetragattii* e *C. decagattii* (sorotipos B/C ou VG1-IV) (Tabela 1) (HAGEN et al., 2015; MAZIARS; PERFECT, 2016).

Tabela 1 - Proposta recente para nova nomenclatura do complexo de espécies *C. gattii* e *C. neoformans*.

Nome atual	Tipo molecular	Nome proposto
<i>C. neoformans</i> Var. <i>grubii</i>	VNI/VNII/VNB (AFLP1, AFLP1A, AFLP1B, VNB)	<i>C. neoformans</i>
Var. <i>neoformans</i>	VNIV (AFLP2)	<i>C. deneoformans</i>
Híbrido AD	VNIII (AFLP3)	<i>C. neoformans</i> x híbrido <i>C. deneoformans</i>
<i>C. gattii</i>	VGI (AFLP4) VGII (AFLP6) VGIII (AFLP5) VGIV (AFLP7) VGIV/VGIIIc (AFLP10)	<i>C. gattii</i> <i>C. deuterogattii</i> <i>C. bacillisporus</i> <i>C. tetragattii</i> <i>C. decagattii</i>
Híbrido DB	AFLP8	<i>C. deneoformans</i> x híbrido <i>C. gattii</i>
Híbrido AB	AFLP9	<i>C. neoformans</i> x híbrido <i>C. gattii</i>
Híbrido AB	AFLP11	<i>C. neoformans</i> x híbrido <i>C. deuterogattii</i>

FONTE: Adaptado Hagen e colaboradores (2015).

No estudo publicado por Kwon-Chung e colaboradores (2017), entretanto, discutiu-se que a proposta de divisão do complexo de duas espécies em 7 espécies haplóides e 4 espécies híbridas merece uma ampla discussão antes de sua adoção. Destacou-se que apesar da

nomenclatura proposta representar um passo importante no reconhecimento da biodiversidade dentro do gênero *Cryptococcus*, ainda há necessidade de estudos mais detalhados. Segundo esses autores, seria necessário um trabalho com maior número de isolados considerando o genoma completo, bem como, uma nomenclatura mais simples.

Hagen e colaboradores (2017), publicaram outro artigo enfatizando a importância do reconhecimento das sete espécies dentro do gênero *Cryptococcus*. Nesse estudo recente, ressaltou-se que a principal vantagem em reconhecer sete espécies ao invés de apenas dois “complexos de espécies”, seria que pesquisadores e clínicos seriam estimulados a buscar maiores diferenças e semelhanças fenotípicas e genotípicas entre os isolados, bem como na susceptibilidade antifúngica. No presente estudo, optou-se por utilizar a nova nomenclatura por entendermos a importância da diferenciação das espécies em nosso trabalho.

1.2 Epidemiologia

A criptococose é uma infecção que apresenta distribuição mundial. Em 2009, estimava-se que o número global de casos de criptococose fosse de cerca de 1 milhão de casos por ano (PARK et al., 2009). Essas estimativas, contudo, eram baseadas em uma coorte da era pré-TAR (Terapia Antirretroviral). Posteriormente, um estudo publicado com base na prevalência de antigenemia criptocócica no sangue de pacientes de 1989 a 2016, revelou uma nova estimativa. De acordo com essa pesquisa, 220.000 novos casos de meningite criptocócica ocorrem todo ano, resultando em 181.000 mortes (RAJASINGHAM et al., 2017). Além disso, o crescente número de indivíduos com outras imunodeficiências, incluindo pacientes transplantados e com câncer, representa uma população de risco para a criptococose (MAZIARS; PERFECT, 2016).

É importante salientar que a maioria desses casos (73% do total) ocorrem na África subsaariana (Figura 1). As regiões que apresentam a segunda maior incidência (19% do total) são a Ásia e o Pacífico (CDC, Centers for Disease Control and Prevention, 2017). É sabido que a África subsaariana tem sido a região global mais fortemente afetada pelo HIV, com cerca de 1,5 milhões de novos casos dessa síndrome por ano (UNAIDS, 2017). Acrescenta-se ainda que, os pacientes infectados pelo HIV têm maior chance de infecção por *Cryptococcus* spp. quando sua contagem de células CD4 cai abaixo de 100 células/ μ L (SLOAN; PARRIS, 2014). No Brasil, de acordo com Giacomazzi e colaboradores (2015), em 2011 foram registrados 6.694 casos de meningite criptocócica em todo o país entre os pacientes com HIV/AIDS.

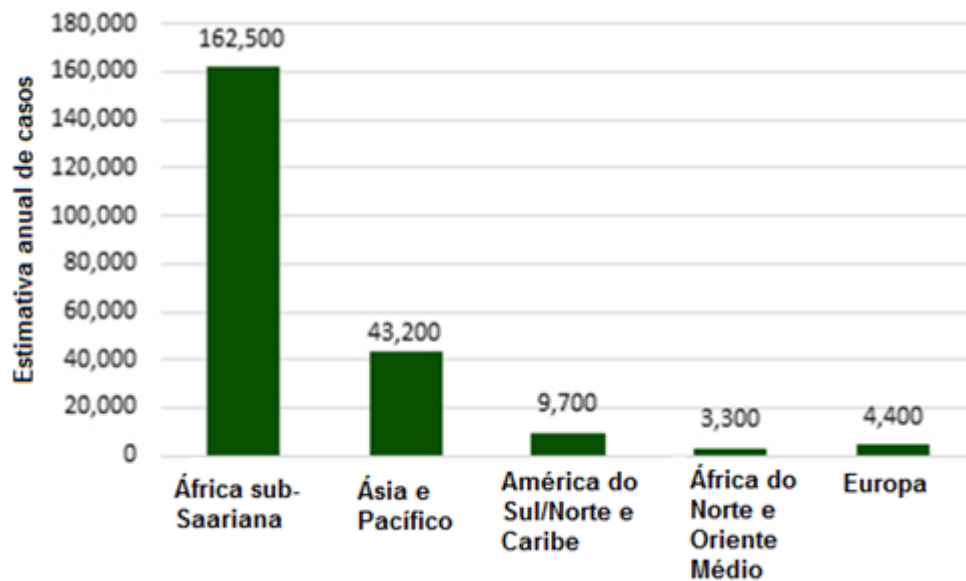


Figura 1 - Número de casos globais de meningite criptocócica relacionada a indivíduos com HIV. Fonte: Adaptado de Rajasingham e colaboradores (2017).

Com relação a distribuição global dos tipos moleculares pode-se observar que VNI e VNII podem ser encontrados globalmente, sendo o primeiro mais prevalente em todo o mundo, com exceção da Austrália e Papua Nova Guiné, onde ocorre o predomínio de VGI (RHODES et al., 2017; BEALE et al., 2015; COGLIATI, 2013). Apesar do trabalho de Litvintseva e colaboradores (2006) observar que a linhagem VNB era predominante na África subsaariana, estudos posteriores apontaram que o genótipo VNB ocorre em outras áreas, visto que foram identificados isolados na América do Sul, Estados Unidos, Itália e China (RHODES et al., 2017; BEALE et al., 2015; NGAMSKULRUNGROJ et al., 2009; BOVERS et al., 2008).

No Brasil, estudos epidemiológicos revelaram uma tendência regional: *C. gattii* é mais prevalente na região norte-nordeste do país, sendo considerado endêmico destas regiões, enquanto *C. neoformans* é predominante na região sul-sudeste (TRILLES et al., 2008). Em relação a identificação do genótipo, nota-se que a maioria dos estudos mostraram o predomínio do genótipo VNI em diferentes estados do Brasil, como em São Paulo, Mato Grosso, Amazonas, Bahia, Piauí, Goiás e Rio de Janeiro (CARDOSO et al., 2018; FAVALESSA et al., 2014; MATOS et al., 2012; MARTINS et al., 2011; SOUZA et al., 2010; IGREJA et al., 2004). Entretanto, em um estudo recente realizado por Wirth e colaboradores (2018), foi identificado o predomínio do genótipo VNII em pacientes com meningoencefalite no estado do Rio Grande do Sul.

Em Minas Gerais, uma pesquisa realizada por Ferreira-Paim e colaboradores (2017) identificou o genótipo VNI em todas as 106 amostras clínicas analisadas. Aguiar e

colaboradores (2017) encontraram um perfil semelhante na cidade de Uberlândia, no qual observou-se que de 41 amostras clínicas, 97,6% foram identificadas como *C. neoformans* genótipo VNI. Em Belo Horizonte não há estudos acerca da prevalência e distribuição dos tipos moleculares de *Cryptococcus* spp. Pincer (2012) realizou um estudo em um hospital da capital mineira com base nos dados de 109 prontuários de pacientes com neurocriptococose, relacionando-os ao gênero, idade, uso de terapia antirretroviral, porém, não identificou os tipos moleculares presentes nas infecções.

Embora o primeiro isolamento de *C. neoformans* tenha sido a partir de suco de pêssago, acredita-se que as fontes saprófitas mais importantes no mundo são excrementos do pombo (*Columba livia*) (KWON-CHUNG et al., 2014). As amostras positivas para *C. neoformans* no solo têm sido principalmente de áreas frequentadas por pombos, galinhas, perus ou ocasionalmente outras espécies aviárias tais como canários, papagaios, aves de munia e periquitos (MCMULLAN et al., 2013; KNOW-CHUNG et al., 2014). De acordo com Mitchell e colaboradores (2011), fontes arbóreas contendo amostras de *C. neoformans* têm sido cada vez mais relatadas em várias partes do mundo. Estudos realizados com mais de 36 gêneros arbóreos evidenciaram o isolamento proveniente da casca, cavidades do tronco da árvore e madeira em decomposição.

Em relação a *C. gattii*, sabe-se que é classificado em dois sorotipos: A e B. Inicialmente, acreditava-se que essa espécie era restrita a regiões tropicais e subtropicais, entretanto, devido ao surto ocorrido na ilha de Vancouver e na costa noroeste do Pacífico, expandiu-se a área geográfica para as regiões temperadas (COGLIATI, 2013). Após o primeiro isolamento do sorotipo B, tipo molecular VGI, de eucaliptos (*Eucalyptus camaldulensis*) na Austrália, um número crescente de árvores vem sendo identificadas como reservatórios ambientais da espécie (SRINGER; CHATURVEDI, 2010). Já foram relatados o isolamento em árvores como eucaliptos, cactos, pinheiros, bem como na casca e no solo, ao redor destas árvores (KNOW-CHUNG et al., 2014; MCMULLAN et al., 2013). Além disso, alguns trabalhos demonstraram ainda o isolamento de *C. gattii* em fezes de aves (ABEGG et al., 2006; FERREIRA; RASO, 2012).

Apesar de muitos autores apontarem uma clara diferenciação de habitats, Cogliati e colaboradores (2016) publicaram um estudo com isolados do Mediterrâneo e concluíram que tanto *C. neoformans* quanto *C. gattii* apresentam associação com árvores, sendo que a prevalência de *C. neoformans* em árvores colonizadas foi 13 vezes maior que *C. gattii*. Dessa forma, esses estudos corroboram com a hipótese de que as árvores poderiam representar um importante nicho ambiental e um reservatório estável para ambas as espécies, e que os excretas

de aves poderiam representar um nicho secundário e temporário especialmente para *C. neoformans*.

1.3 Patogênese

A infecção ocorre por meio da inalação de basidiósporos ou leveduras dessecadas que penetram o trato respiratório e alcançam o pulmão, local em que começam a se reproduzir e a invadir outros tecidos (Figura 2). Devido ao reduzido tamanho dos propágulos fúngicos (1,5 – 3,5 μm), eles alcançam as vias áreas distais e entram em contato com os macrófagos alveolares (MAY et al., 2015). Considera-se que a infecção pulmonar primária seja assintomática ou minimamente sintomática. Os macrófagos ativados desencadeiam uma resposta imunológica, que recruta mais células do sistema imune e ocasiona uma inflamação granulomatosa (KWON-CHUNG et al., 2014; MAZIARS; PERFECT, 2016).

É interessante ressaltar que os macrófagos são células do sistema imune especializadas na eliminação de patógenos por meio de um mecanismo de fagocitose e degradação, dessa forma, constituem uma das primeiras linhas de defesa inata do hospedeiro contra infecções pulmonares por *C. neoformans* (FAN et al., 2005; NICOLA; CASADEVALL, 2012). A resposta do hospedeiro à infecção criptocócica envolve principalmente células T auxiliares com citocinas, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF), interferon- γ e interleucina-2.

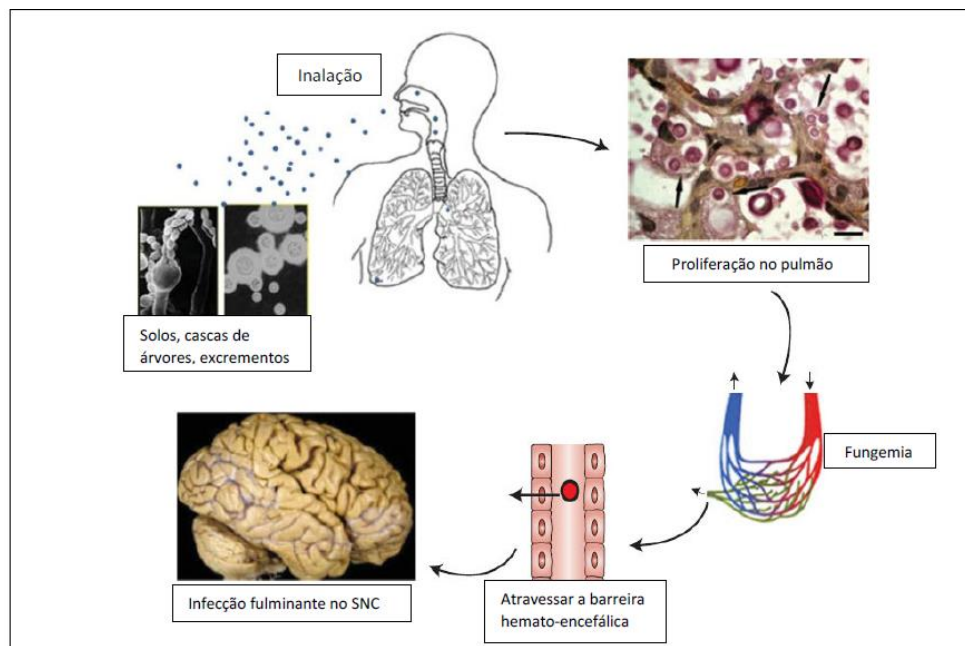


Figura 2 - Patogênese da meningoencefalite criptocócica. Células fúngicas transportadas pelo ar que são inaladas pelo hospedeiro e proliferam no pulmão, depois se disseminam por meio da corrente sanguínea para o cérebro. Fonte: Adaptado de KWON-CHUNG e colaboradores (2014).

A princípio, quando exposto ao ambiente pulmonar, *C. neoformans* pode modificar sua morfologia para a forma titânica, ou seja, quando se tem o aumento da cápsula, o que dificulta a fagocitose e constitui um importante fator de proteção contra a resposta imune inata do indivíduo (ZARAGOZA; NIELSEN, 2013). As células titânicas podem apresentar de 50 a 100 µm de diâmetro (ZARAGOZA et al., 2010; OKAGAKI et al., 2010). Essas células gigantes podem estimular a morte dos fagócitos seja pela produção de toxinas ou pela alteração na morfologia, impedindo o englobamento (OKAGAKI; NIELSEN, 2012). Além disso, Negroni (2012) destaca que o excesso de produção de antígeno capsular impede a fagocitose efetiva e a formação de granulomas, que restringem a infecção. Em determinadas circunstâncias, a levedura pode estabelecer uma infecção latente dentro do fagolisossoma, com leveduras dormentes e ainda viáveis dentro dos linfonodos torácicos ou um granuloma pulmonar que pode persistir por anos em pacientes assintomáticos. Quando a imunidade local é suprimida, a levedura poderá crescer e disseminar-se para fora desses complexos de linfonodos pulmonares (MAZIARS; PERFECT, 2016).

Em pacientes imunocomprometidos, as células fúngicas se proliferam no pulmão, podendo se disseminar por meio da corrente sanguínea até o cérebro atravessando a barreira hematoencefálica (BHE) (GOULART et al., 2010). Existem três mecanismos propostos para a penetração na barreira hematoencefálica (Figura 3). Na paracitose, as células de *Cryptococcus* spp. podem forçar sua passagem entre as junções firmes das células endoteliais. Nesse processo são usadas metaloproteases tais como Mpr1 a fim de promover a migração transendotelial (MAY et al., 2015; WILLIAMSON et al., 2016). Em estudos utilizando técnicas de imagem intravital, foi observado que as células fúngicas induzem um evento embólico na microvasculatura, aprisionando as leveduras no endotélio por um processo passivo (KRONSTAD et al., 2011). Contudo, após essa etapa, a migração criptocócica para o tecido cerebral é um processo ativo, no qual as células fúngicas precisam estar vivas e depende da secreção da enzima urease (MAY et al., 2015).

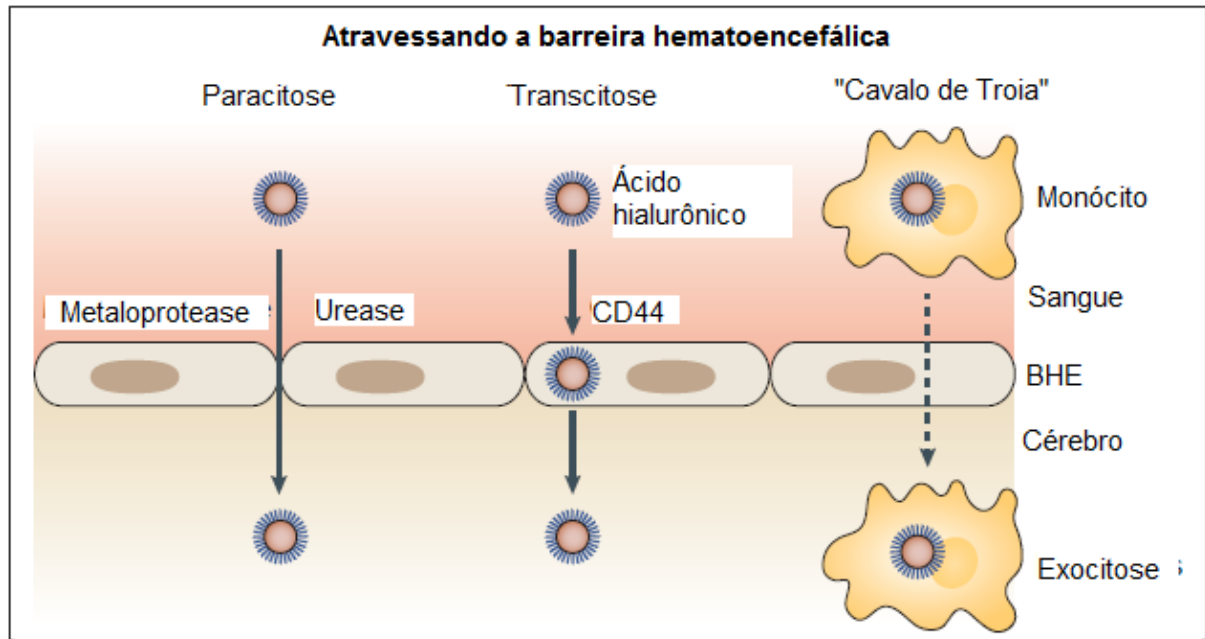


Figura 3 - Disseminação de células fúngicas na barreira hematoencefálica (BHE). Fonte: Adaptado de May e colaboradores (2015).

A transcitose é outro mecanismo de penetração por meio da BHE no qual o ácido hialurônico presente na superfície das células criptocócicas se liga ao receptor CD44 no endotélio luminal, unindo a levedura à célula do hospedeiro. Esta ligação induz o remodelamento da actina dependente da proteína quinase C, o que permite o englobamento da célula fúngica (MAY et al., 2015). É interessante destacar que durante a transcitose podem haver mudanças morfológicas específicas como parte desse processo, como a adoção de uma morfologia mais oval (KRONSTAD et al., 2011).

Santiago-Tirado e colaboradores (2017) observaram que as células de *Cryptococcus* poderiam também ser transportadas pelo sangue até o cérebro dentro de fagócitos mononucleares, o chamado mecanismo “Cavalo de Troia”. Em um estudo realizado com camundongos foi observado que a depleção de macrófagos alveolares reduzia a disseminação das células criptocócicas para o SNC (KRONSTAD et al., 2011; MAY et al., 2015). Acredita-se que tanto *C. neoformans* quanto *C. gattii* podem escapar dos macrófagos do hospedeiro por meio de um processo de expulsão não-destrutivo em que o patógeno e a célula hospedeira permanecem viáveis (KRONSTAD et al., 2011). No entanto, apesar dos mecanismos de paracitose, transcitose e “cavalo de Troia” serem diferentes, considera-se que durante o processo de infecção natural esses mecanismos possam atuar em conjunto (MAY et al., 2015).

Salienta-se que as modificações no metabolismo fúngico podem ter implicações significativas na patogênese da doença (SORRELL et al., 2016). Alguns autores como Chang e colaboradores (2007) abordaram que no sistema nervoso central, as células fúngicas se

adaptariam aos níveis subótimos de oxigênio e as condições nutricionais, multiplicando-se e podendo causar a meningoencefalite.

1.4 Fatores de Virulência

Cryptococcus spp. apresenta uma ampla variedade de fatores de virulência, como cápsula polissacarídica, produção de melanina, capacidade de crescimento a 37°C e produção de enzimas, tais como fosfolipase, proteinase e urease (ALSPAUGH, 2015) (Figura 4). Esses fatores podem modificar a resposta imune do hospedeiro e melhorar a sobrevivência do patógeno (VOELZ; MAY, 2010).

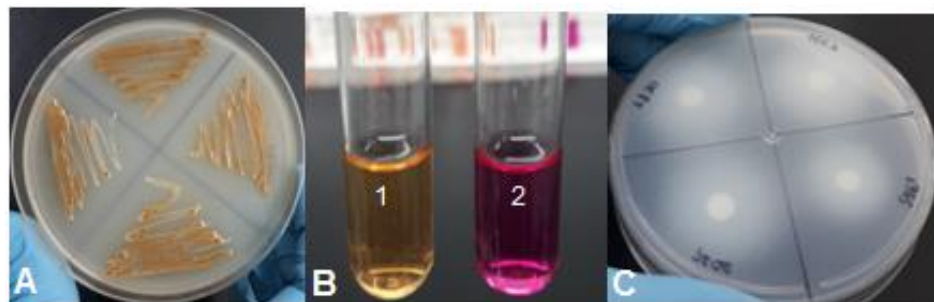


Figura 4 - Fatores de Virulência. A) Produção de melanina. B) Produção de urease (tubo 1 indica controle e tubo 2 indica isolado positivo). C) Produção de proteinase. Fonte: Lima, CM; 2019.

A cápsula polissacarídica é considerada um dos principais fatores de virulência de *Cryptococcus* spp., sendo constituída por uma rede contendo glucoronoxilomanana (GXM) e galactoxilomana (GalXM) (NIMRICHTER et al., 2007; ROBERTSON et al., 2014; ALSPAUGH, 2015). Ressalta-se ainda, a importância da cápsula tanto para a patogênese bem como para a sobrevivência de *Cryptococcus* spp. no meio ambiente. Há relatos na literatura de que a expressão da cápsula fúngica aumentaria a resistência contra a dessecação e o efeito das radiações solares (ZARAGOZA et al. 2009; ALSPAUGH, 2015).

A cápsula apresenta uma forte propriedade antifagocítica, responsável por isolar a célula fúngica das células imunes do hospedeiro, bem como de fatores de reconhecimento de padrões (CORDERO et al., 2013). Okagaki e Nielsen (2012), destacaram que a cápsula é capaz de se ligar tanto ao anticorpo quanto ao complemento C3, impedindo a fagocitose. Todavia, essa proteção contra a fagocitose seria mais evidente durante as primeiras 24 horas após a infecção. Esse é um importante mecanismo, uma vez que, o estabelecimento da criptococose depende da sobrevivência do fungo nos alvéolos pulmonares. Em um estudo realizado por Chiapello e colaboradores (2008), foi observado que a GXM é responsável por modular a produção de

óxido nítrico em fagócitos. Convém ressaltar, que o aumento da cápsula em *C. neoformans* também confere maior proteção contra o estresse oxidativo e nitrosativo (OKAGAKI; NIELSEN, 2012).

Em linhas gerais, temos que durante a infecção no interior do hospedeiro, a cápsula sofre alterações no tamanho, estrutura, e na proporção em relação ao volume celular total. Essas alterações podem ser visualizadas ao microscópio óptico por meio da imersão dessas células em tinta nanquim. Acredita-se que tais mudanças sejam estimuladas devido à fatores como a limitação de ferro e CO₂ fisiológico, que serão responsáveis por modular a resposta imune do hospedeiro. (ROBERTSON et al., 2014; BOSE et al., 2003). Zaragoza e colaboradores (2009) concluíram que o aumento da cápsula em *C. neoformans* poderia contribuir para maior absorção do ferro. De igual modo, alguns estudos demonstraram que as diferenças no tamanho da cápsula podem ter influência na virulência e no efeito sobre os macrófagos (KWON-CHUNG et al., 2014; ZARAGOZA et al., 2009).

A melanina é considerada o único pigmento com múltiplas funções que é encontrado em todos os reinos biológicos e considerado um importante fator de virulência dos fungos. *Cryptococcus* spp. apresenta a eumelanina que é derivada de substratos como a 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA), bem como outros compostos polifenólicos (KWON-CHUNG et al., 2014). Acredita-se que esse pigmento confere proteção contra estresses ambientais como a luz ultravioleta, agentes oxidantes e radiação ionizante (EISENMAN; CASADEVALL, 2012). Além disso, alguns estudos sugerem que a melanina possa ter influência na resistência aos antifúngicos tais como anfotericina B, caspofungina e azólicos (ALMEIDA et al., 2015).

É importante destacar que a melanina é sintetizada pela enzima lacase, uma proteína contendo cobre glicosilado com a habilidade de oxidar compostos difenólicos (ALMEIDA et al., 2015). Acrescenta-se ainda que a lacase é capaz de gerar outros produtos, tais como, dopamina O-quinona que é espontaneamente convertido em dopaminocromo, um componente citotóxico no cérebro (KWON-CHUNG et al., 2014). Além disso, essa enzima possui atividade ferro oxidase, que reduz a formação de radicais hidroxila em macrófagos (AZEVEDO et al., 2016). Alguns estudos demonstram ainda que o cobre é utilizado como cofator das enzimas presentes na via de biossíntese (EISENMAN; CASADEVAL, 2012).

As espécies do gênero *Cryptococcus* apresentam dois genes lacase no genoma, LAC1 e LAC2, mas apenas LAC1 é expresso significativamente na maioria das condições. Observa-se que a virulência é reduzida quando LAC1 é deletado (KWON-CHUNG et al., 2014). É interessante ressaltar que há diferenças na localização celular das duas lacases: a lacase codificada por LAC1 está localizada predominantemente na parede celular e a codificada por

LAC2, encontra-se no citoplasma (AZEVEDO et al., 2016; EISENMAN; CASADEVAL, 2012). Além disso, o cérebro é rico em substratos para essa enzima, tais como a dopamina, o que poderia explicar o tropismo das células criptocócicas pelo sistema nervoso central (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008).

As fosfolipases constituem um grupo heterogêneo de enzimas capazes de hidrolisar uma ou mais ligações éster em glicerofosfolipídeos e também constituem um fator de virulência em *Cryptococcus* spp. A ação das fosfolipases pode resultar na desestabilização da membrana e lise celular influenciando na adesão as células epiteliais, e promovendo assim, a invasão tecidual no hospedeiro (PINI et al., 2017; AZEVEDO et al., 2016). *C. neoformans* apresenta fosfolipase B, fosfolipase C, lisofosfolipase e aciltransferase (ALMEIDA et al., 2015). A fosfolipase B é transportada para a superfície celular em vesículas e sua secreção é dependente de um fosfatidilinositol. O transporte da enzima para a superfície celular melhora a adesão das células fúngicas ao epitélio pulmonar, que é o primeiro passo no estabelecimento da criptococose pulmonar (COELHO et al., 2014; PINI et al., 2017). A fosfolipase C, por sua vez, contribui para a regulação da homeostase, separação celular após a citocinese e manutenção da integridade da parede celular (ALMEIDA et al., 2015).

A importância da urease como fator de virulência foi investigada pela primeira vez por Cox e colaboradores (2000). Essa enzima auxilia na proliferação fúngica no pulmão, uma vez que promove o acúmulo de células dendríticas imaturas, bem como, a resposta imune T2 não protetora. Ademais, essa enzima contribui para a disseminação das células fúngicas para o sistema nervoso central, uma vez que, aumenta a captura do patógeno pelos microcapilares, auxiliando assim, na penetração da barreira hematoencefálica (AZEVEDO et al., 2017). O mecanismo de ativação dessa apoenzima tem sido amplamente estudado, e acredita-se que proteínas acessórias como Ura4, Ura6 e Ura7 podem estar envolvidas nesse processo (KWON-CHUNG et al., 2014).

Voelz e May (2010) destacaram ainda a importância do sistema antioxidante de *Cryptococcus* spp., como um efetivo fator de virulência. No hospedeiro, as células imunes incluindo monócitos, neutrófilos e macrófagos liberam espécies reativas em resposta à infecção fúngica. Esse estresse oxidativo é tóxico, porém, as células fúngicas apresentam seu próprio sistema de defesa com o intuito de neutralizar as espécies reativas. Este sistema seria composto principalmente por enzimas como superóxido dismutases (SODs), peroxidases (PERs) e catalases (NARASIPURA et al., 2005; JÉSUS-BERRÍOS et al., 2003).

A superóxido dismutase (SOD) converte o superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio, além de facilitar o crescimento das células fúngicas no interior dos macrófagos

(ALMEIDA et al., 2015). Pelo menos duas SODs são produzidas por *Cryptococcus* spp.: SOD1 e SOD2. A SOD1 atua principalmente mediando a resistência ao ataque de superóxidos por neutrófilos (AZEVEDO et al., 2016). Observa-se que a SOD2, uma superóxido dismutase mitocondrial de manganês, está relacionada ao aumento da adaptação de *C. neoformans* a temperatura corporal humana. A SOD2 regula as concentrações de radicais de oxigênio na mitocôndria e contribui para a integridade da cadeia transportadora de elétrons (BROWN et al., 2007). De igual modo, a habilidade de crescer robustamente a 37°C, representa um importante fator de virulência para *C. neoformans* e *C. gattii* (KWON-CHUNG et al., 2014).

1.5 Manifestações clínicas

Sabe-se que *C. neoformans* e *C. gattii* estabelecem a infecção nos pulmões, sendo este órgão considerado o foco primário da doença, e após isso, pode ocorrer a disseminação para o SNC. Contudo, a infecção pode se estabelecer em outros locais do corpo, tais como: pele, próstata, olhos, ossos e causar até criptocemia (SKOLNIK et al., 2017). As manifestações clínicas pulmonares variam desde a colonização assintomática das vias aéreas ou um simples nódulo pulmonar até pneumonia com a presença de síndrome respiratória aguda, que pode levar o indivíduo a óbito (MAZIARS; PERFECT, 2016). A apresentação radiológica é caracterizada por um conjunto de resultados, incluindo nódulos únicos ou múltiplos, consolidação segmentar ou lobar, lesões cavitárias e um padrão intersticial difuso (BRIZENDINE et al., 2011).

É importante destacar que em indivíduos assintomáticos, a infecção pulmonar isolada pode ocorrer em cerca de um terço dos pacientes e pode ser identificado por meio de uma simples radiografia de tórax (NEGRONI, 2012). Estima-se que o envolvimento pulmonar varia de 10% a 55% entre os indivíduos com meningoencefalite criptocócica associada a AIDS, embora, os sintomas no SNC predominam no quadro clínico (MAZIARS; PERFECT, 2016).

As infecções cutâneas representam a terceira manifestação mais comum da criptococose. A lesão inicial constitui-se de uma pápula indolor que suaviza no centro e ulcera no ápice (NEGRONI, 2012). A infecção cutânea primária é muito rara e geralmente está associada a lesão na pele e inoculação direta da levedura. Destaca-se que essas lesões são indistinguíveis daquelas causadas por outros agentes infecciosos, sendo necessário uma biópsia da pele para um diagnóstico definitivo (MAZIARS; PERFECT, 2016). Acrescenta-se ainda que anormalidades oculares podem ser encontradas em pacientes com meningite criptocócica. As manifestações oculares mais comuns incluem papiledema causado por hipertensão intracraniana,

paralisia do nervo ocular motor, incluindo até a completa perda da visão (CHAYAKULKEEREE; PERFECT, 2006).

As manifestações do SNC incluem múltiplos sinais e sintomas como dor de cabeça, febre, neuropatias cranianas, estado mental alterado, letargia, perda de memória e sinais de irritação nas meninges (WILLIAMSON et al., 2016). Em indivíduos HIV negativos, pode ocorrer a meningoencefalite crônica ou subaguda que afeta particularmente os gânglios basais (NEGRONI, 2012). Todavia, em indivíduos imunocomprometidos a carga fúngica geralmente é alta, e assim, esses doentes podem ter início mais curto dos sinais e sintomas, maiores títulos de antígeno polissacarídico no líquido e maior pressão intracraniana do que outros indivíduos imunocompetentes (MAZIARS; PERFECT, 2016).

Convém ressaltar ainda que pacientes com meningite criptocócica associada a AIDS, podem apresentar uma deterioração neurológica adicional ao iniciarem uma terapia antirretroviral (TAR) combinada (CHANG et al., 2013). A maior parte desses sintomas adicionais estão relacionados à Síndrome Inflamatória da Reconstituição Imune (IRIS). A criptococose associada a IRIS ocorre em pacientes diagnosticados com a doença que receberam terapia antifúngica antes do início da TAR e tipicamente apresentam meningite asséptica (ESCHKE et al., 2015). Várias manifestações clínicas já foram relatadas, tais como, alta pressão craniana associada a meningite, pneumonia necrotizante, aumento de lesões inflamatórias do SNC, linfadenite, bem como lesões de pele, tecido mole, ossos e articulações. Essas lesões geralmente apresentam reações granulomatosas com necrose focal, ausência de estruturas fúngicas e cultura negativa para *C. neoformans* (COLOMBO et al., 2010; BICANIC et al., 2009). Estima-se que 20% dos pacientes dos pacientes com AIDS e co-infecção por *Cryptococcus* spp. tratados com TAR, apresentam essa síndrome (ESCHKE et al., 2015).

1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da criptococose é considerado relativamente fácil com múltiplos métodos e estratégias (PERFECT; BICANIC, 2015). Pode ser realizado o exame microscópico direto, isolamento de *C. gattii* e *C. neoformans* em cultura e a demonstração de antígeno capsular por aglutinação de partículas de látex ou ensaio de imunoabsorção enzimática (HUSTON; MODY, 2009). Os tecidos e materiais usados para o diagnóstico consistem de líquido cefalorraquidiano, fluido pleural além de espécimes da pele, pulmão e medula óssea (NEGRONI, 2012).

O teste microscópico direto é realizado com tinta nanquim diluída ou microscopia de fase de contraste. Esse teste apresenta sensibilidade de cerca de 70-90% em pacientes

imunossuprimidos. Nos casos de indivíduos sem AIDS, o teste apresenta sensibilidade de cerca de 40% (NEGRONI, 2012). Contudo, a sensibilidade é reduzida quando há uma baixa carga fúngica como no caso de pessoas que apresentam precocemente os sintomas ou que estão sob o uso de terapias antirretrovirais. Acredita-se que em amostras de líquido com 1000 UFC/mL a sensibilidade seja inferior a 42% (ABASSI et al., 2015).

A cultura é considerada o padrão ouro para o diagnóstico da criptococose, entretanto, apresenta algumas limitações como o tempo necessário para o desenvolvimento e identificação fúngica (ABASSI et al., 2015). *Cryptococcus* spp. pode ser isolado na maioria dos meios utilizados na rotina laboratorial, sendo mais frequente o uso do ágar Sabouraud Dextrose e o ágar Infusão Cérebro-Coração (BHI). A adição de antibióticos permite o isolamento de culturas puras a partir de amostras provenientes de diversos sítios. A ciclohexamida é comumente usada para inibir o crescimento de fungos filamentosos (GAZZONI et al., 2009). Destaca-se ainda a importância do cultivo em meio ágar níger que contém semente de níger (*Guizotia absyssinica*). Essa semente é rica em compostos fenólicos que vão servir de substrato para a ação da enzima fenoloxidase (NEGRONI, 2012). É possível ainda realizar o teste de hidrólise da ureia, no qual a ureia é hidrolisada resultando na alcalinização e consequente mudança na coloração do meio de cultura (COX et al., 2000).

A diferenciação das espécies *C. gattii* e *C. neoformans* pode ser feita pelo cultivo no meio seletivo CGB (canavanina-glicina-azul de bromotimol). *C. gattii* é capaz de hidrolisar a glicina, utilizando-a como única fonte de carbono e nitrogênio. Esse processo forma compostos alcalinos que vão alterar o pH, modificando a cor do meio de amarelo para azul cobalto (HUSTON; MODY, 2009). *C. neoformans* não é capaz de degradar a glicina, e devido a isso, o meio permanece amarelo-esverdeado (KWON-CHUNG et al., 2014) (Figura 5).

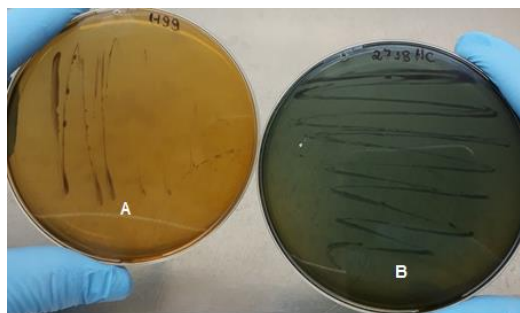


Figura 5 - Diferenciação de isolados de *Cryptococcus* em meio CGB. A) Não ocorreu alteração na coloração do meio, indicativo de *C. neoformans*. B) Mudança na coloração do meio, indicativo de *C. gattii*. Fonte: Lima, CM.; 2019.

A detecção do antígeno criptocócico (CrAg) no líquido, soro ou plasma tornou-se uma ferramenta essencial no diagnóstico da criptococose e pode ser realizado no líquido de pacientes HIV positivo que apresentem suspeita de meningite ou qualquer sintoma no SNC (ABASSI et

al., 2015). No teste de aglutinação em látex a sensibilidade relatada é de 93-100% com uma especificidade de 93-98% (HUSTON; MODY, 2009). É interessante ressaltar que a taxa de falso-positivo é inferior a 1% e geralmente é explicado por problemas técnicos ou outras infecções, incluindo reações cruzadas com antígenos tais como espécies de *Trichosporon* (PERFECT; BICANIC, 2015), e menos frequentemente, em casos de mucormicose, penicilose e histoplasmoses (NEGRONI, 2012). Destaca-se ainda que os títulos de antigenia são proporcionais à carga fúngica, portanto, títulos elevados são um sinal de gravidade (HUSTON; MODY, 2009).

O recente desenvolvimento do ensaio de fluxo lateral (LFA) revolucionou o diagnóstico da criptococose (PERFECT; BICANIC, 2015; HANSEN et al., 2013). O LFA é um teste de ponto de cuidado que detecta rapidamente a cápsula polissacarídica usando anticorpos monoclonais anti-criptocócicos conjugados com partículas de ouro direcionadas contra *C. neoformans*. O teste semi-quantitativo LFA oferece muitas vantagens incluindo estabilidade à temperatura ambiente, não requer uma cadeia de frio ou laboratório centralizado, apresenta baixo custo e é rápido, sendo necessário apenas 10 minutos para obter os resultados (ABASSI et al., 2015). Além disso, o teste LFA é considerado 100 vezes mais sensível aos polissacarídeos nos quatro sorotipos de *C. neoformans* do que os testes de aglutinação de látex (WILLIAMSON et al., 2016).

A detecção de isolados de *Cryptococcus* spp. que não apresentam cápsula, contudo, constitui um desafio para as abordagens diagnósticas convencionais. Sugiura e colaboradores (2017) relataram a dificuldade do diagnóstico de meningite crônica causada por um isolado de *C. neoformans* sem cápsula. De acordo com os autores, não havia crescimento em cultura do líquido e o teste de aglutinação em látex era negativo. Assim, é necessário considerar outras abordagens diagnósticas para isolados acapsulares presentes em amostras clínicas, tais como, ferramentas de identificação molecular.

Os sistemas de identificação que utilizam biologia molecular como a reação em cadeia da polimerase (PCR) representam um método alternativo para a detecção inicial da criptococose (ABASSI et al., 2015). Em um estudo realizado por Rhein e colaboradores (2015) com 69 pacientes infectados com HIV e suspeita de meningite na Uganda, a detecção por PCR apresentou 100% de sensibilidade e especificidade comparado a cultura criptocócica, sendo capaz de diferenciar entre as espécies de *Cryptococcus* envolvidas. É importante destacar que a PCR permite a distinção entre a Síndrome Inflamatória da Reconstituição Imune (IRIS) dos casos de recidivas (ABASSI et al., 2015). Graciele-Melo e colaboradores (2016) destacaram

ainda a vantagem do diagnóstico em pacientes com baixa carga fúngica e o uso de menor quantidade de amostra sem a necessidade de isolamento prévio.

Vale ressaltar que as metodologias utilizadas para identificação dos tipos moleculares de *Cryptococcus* spp., permitiram avanços no diagnóstico, bem como, a compreensão das relações filogenéticas e epidemiológicas desse grupo (SIDRIM et al., 2010). Chong e colaboradores (2010) também demonstraram diferenças significativas entre os tipos moleculares de *C. neoformans* e *C. gattii* na resposta *in vitro* à agentes antifúngicos. Assim, a tipagem molecular poderia auxiliar na escolha do tratamento da criptococose (TRILLES et al., 2012). Nesse contexto, as principais técnicas utilizadas são: PCR *fingerprint*, RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao Acaso), RFLP (Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição), AFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos Amplificados) e MLST (Tipagem por Sequenciamento Multilocus) (SIDRIM et al., 2010).

1.7 Tratamento e Resistência aos Fármacos

As recomendações para o tratamento da criptococose são semelhantes para *C. gattii* e *C. neoformans*. Estas recomendações são categorizadas pelo estado imune do hospedeiro (HIV positivo ou HIV negativo) e o órgão envolvido (criptococose respiratória com ou sem envolvimento do SNC) (HUSTON, MODY, 2009). Em 2000, a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas publicou o primeiro guia de manejo para a criptococose, e uma versão atualizada em 2010. Os principais medicamentos indicados por este guia consistem na anfotericina B e azólicos (PERFECT et al., 2010).

Os azólicos são amplamente utilizados para o tratamento de infecções fúngicas e são considerados fungistáticos (DAY *et. al.*, 2013; BABAZEDEH-QAZIZAHANI et al., 2014). Apresentam como mecanismo de ação a inibição da enzima 14 α -demetilase no complexo citocromo P450, que está envolvido na conversão do lanosterol em ergosterol (GULLO et al., 2013). Frequentemente são utilizados o fluconazol e itraconazol. Entre os azólicos de nova geração tem destaque o voriconazol, posaconazol e ravuconazol (PFALLER, 2012; BABAZEDEH-QAZIZAHANI et al.; 2014).

A anfotericina B pertence à classe dos polienos e consiste de um metabólito secundário de *Streptomyces nodosus*, tendo sido o principal agente terapêutico para a meningite criptocócica desde 1960. Embora às vezes usado sozinho, tornou-se comum a partir de 1980 seu uso em combinação com outros antifúngicos (KWON-CHUNG et al., 2014). Esse fármaco apresenta atividade fungicida e se liga ao ergosterol, um esterol da membrana fúngica como

parte do seu mecanismo de ação (DELATIN et al., 2014; ROEMER; KRYSAN, 2014). Mesa-Arango e colaboradores (2014) abordaram que a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) também seria um importante mediador no efeito fungicida da anfotericina B. Outros estudos discutiram que além da produção de ERO, esse fármaco estimularia o aumento de espécies reativas de nitrogênio (FERREIRA, et al.2013; JÉSUS-BERRÍOS et al., 2003).

Para o tratamento da criptococose, pode ser ainda utilizada a flucitosina (5-F), um análogo da pirimidina, que inibe a síntese de DNA e proteínas (GULLO et al., 2013). O 5F é transportado para o interior das células fúngicas e é desaminado para 5-fluoracil (5-FU) pela citosina desaminase, que não está presente em células de mamíferos. Em seguida, incorpora-se ao DNA, interferindo em sua síntese. Pode haver ainda a conversão em 5-fluoridina, que poderá se incorporar ao RNA fúngico, interrompendo a síntese protéica (CARMONA; LIMPER, 2017).

O tratamento da criptococose é dividido em três etapas, sendo estas: indução, consolidação e manutenção. A etapa de indução compreende um período de seis a doze meses para infecção pulmonar, e de duas semanas para infecção disseminada (MORETTI et al., 2008; ALMEIDA; MACHADO, 2014). O objetivo da terapia de indução é a rápida esterilização do líquido. As taxas mais lentas de depuração da levedura demonstram estar associadas ao aumento da mortalidade entre 2 a 10 semanas (ABASSI et al., 2015).

Durante as fases de indução e consolidação, é recomendado o uso de anfotericina B em combinação com flucitosina, seguido do fluconazol por 10 semanas. Pode-se ainda utilizar a formulação lipídica da anfotericina B por 6 a 10 semanas. Na fase de manutenção é recomendado o uso de fluconazol ou itraconazol por um ano (CHAYAKULKEEREE; PERFECT, 2006). Para o tratamento da criptococose pulmonar existe ainda a possibilidade de substituir o fluconazol por outros azólicos, bem como a combinação com corticosteroides (GULLO et al., 2013).

Apesar das consistentes recomendações de tratamento, o acesso mundial aos fármacos antifúngicos continua sendo insuficiente. No caso da anfotericina B, seu uso é dificultado pelo custo, bem como dificuldade em administrar e monitorar os efeitos adversos como a nefrotoxicidade e anemia (LOYSE et al., 2013). As preparações de anfotericina B lipossomal são muito mais caras, porém, apresentam eficácia semelhante com menor toxicidade (PERFECT; BICANIC, 2015). A combinação de anfotericina B e flucitosina tem sido indicado para infecções no SNC, devido a atividade sinérgica desses fármacos, excelente capacidade de penetração no SNC e rápida atividade fungicida, contudo, a flucitosina não está disponível no Brasil (WHITNEY; BICANIC, 2015). Na África subsaariana, o fluconazol é utilizado como

terapia primária para o tratamento da criptococose, sendo que a anfotericina B e flucitosina comumente não são utilizados devido ao elevado custo e dificuldade na administração (MAKADZANGE et al., 2010).

Nos últimos anos, tem sido relatado muitos casos de linhagens de *Cryptococcus* spp. resistentes. A resistência microbiana se desenvolve devido a mutações que ocorrem naturalmente nas células, sendo que os fármacos podem atuar como agentes seletivos, causando assim, uma população mais resistente (GULLO et al., 2013; CARMONA; LIMPER, 2017). No caso dos azólicos, um mecanismo chave de resistência contra o fluconazol é a seleção de subpopulações criptocócicas intrinsecamente resistentes que carregam distúrbios cromossômicos específicos e, dessa forma, podem superexpressar ERG11 (que codifica o alvo de ação do fluconazol, a enzima 14 α -demetilase) ou aumentar o efluxo do fármaco por superexpressar genes homólogos de transportadores ABC (cassetes que se ligam ao ATP) (GULLO et al., 2013; MAY et al., 2015). Babazadeh-Qazijahani e colaboradores (2014), observaram ainda que a farmacocinética deficiente dos azólicos é também responsável pela sua resistência, uma vez que a absorção oral destes fármacos é variável.

A resistência aos polienos é mais incomum, entretanto, foi relatada em *C. neoformans*, com mutações na síntese de esteróis e, portanto, alteração no alvo de ação (MAY et al., 2015). Em relação a 5-FC, mutações únicas em pontos variáveis ao longo das vias intracelulares podem levar a resistência clínica e *in vitro*. A monoterapia com 5-FC, contudo, não é apropriada devido a rápida seleção de isolados resistentes, levando a falha no tratamento. Assim, a 5-FC deve ser sempre combinada com fluconazol ou anfotericina B (MERRY; BOULWARE, 2016).

Além da resistência aos antifúngicos, outro fator relevante e que deve ser considerado é a falta de correlação estatística entre os testes *in vitro* recomendados pelo CLSI (Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais) e os resultados clínicos (DANNAOUI et al., 2006). Espinel-Ingroff e colaboradores (2012) observaram diferenças nos valores de CIM entre diferentes meios de cultura, ressaltando a discrepância dos testes de susceptibilidade utilizando diferentes metodologias. Um trabalho publicado por Grossman e Casadeval (2017), destacou ainda que as distintas condições fisiológicas entre o crescimento de *C. neoformans in vivo* e sob condições *in vitro* de laboratório, podem resultar em diferenças significativas na susceptibilidade aos antifúngicos. Dessa forma, seria necessário adaptar os protocolos convencionais de modo a mimetizar as condições de crescimento *in vivo*, além de identificar marcadores genéticos e padrões de expressão associados à falha no tratamento.

2 JUSTIFICATIVA

A criptococose é uma infecção fúngica que apresenta distribuição mundial. Os principais agentes etiológicos são *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*, que possuem diversos fatores de virulência que contribuem para a infecção, colonização e resistência aos agentes antifúngicos.

Com o avanço das técnicas de biologia molecular tem sido cada vez mais frequente a identificação dos tipos moleculares dessas espécies. Muitos estudos têm relacionado os tipos moleculares a características tais como a susceptibilidade aos antifúngicos e a virulência no hospedeiro. Observa-se na literatura que os testes de susceptibilidade aos antifúngicos para algumas espécies do gênero *Candida*, podem ser usados para direcionar a escolha do melhor fármaco e dosagem a ser utilizada no tratamento do paciente. No entanto, para *Cryptococcus* spp., a correlação entre os resultados de atividade antifúngica *in vitro* e predição no tratamento ainda não estão bem estabelecidos.

Dentro deste contexto, o presente estudo propõe-se a identificar os diferentes tipos moleculares encontrados nos isolados clínicos sugestivos de infecção por *Cryptococcus* spp. provenientes de hospitais de Belo Horizonte, MG, bem como avaliar os fatores de virulência e perfil de susceptibilidade aos antifúngicos. Os resultados obtidos foram também correlacionados aos dados dos prontuários dos pacientes.

É importante ressaltar que devido à alta taxa de mortalidade associada a meningite criptocócica, a prática clínica se beneficiaria com estudos voltados na busca de dosagens ideais de antifúngicos para estas infecções. Dessa forma, esse trabalho visa contribuir para o melhor entendimento da criptococose e seu tratamento, com ênfase para as diferentes espécies moleculares causadoras dessa doença.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar os isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. provenientes do Hospital Eduardo de Menezes e Santa Casa de Belo Horizonte, e avaliar a susceptibilidade aos antifúngicos e virulência, correlacionando com dados clínicos.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar por metodologias de biologia molecular os diferentes tipos moleculares e sorotipos de *Cryptococcus* spp. provenientes de amostras clínicas;
- Avaliar *in vitro* o perfil de susceptibilidade a diferentes antifúngicos;
- Analisar a virulência dos diferentes isolados clínicos quanto a produção de melanina, urease, fosfolipase, proteinase e termotolerância;
- Comparar a virulência dos isolados em modelo invertebrado de *Tenebrio molitor*;
- Confrontar o perfil de susceptibilidade encontrado *in vitro*, com o resultado do tratamento no paciente por meio da análise dos prontuários médicos;

4 METODOLOGIA

4.1 Origem dos isolados

O presente estudo foi realizado com amostras de pacientes atendidos de março de 2017 até agosto de 2018 no Hospital Eduardo de Menezes e Santa Casa de Belo Horizonte- MG. O Hospital Eduardo de Menezes (HEM) é um hospital público, da rede FHEMIG, conveniado à rede SUS de Belo Horizonte, localizado no bairro Bonsucesso, na regional do Barreiro. É importante ressaltar que o HEM é considerado referência estadual para o tratamento de doenças infectocontagiosas e dermatologia sanitária, atuando também na pesquisa, formação e capacitação profissional. O ambulatório do hospital desempenha importante papel como parte do Programa de Integração Adequada dos Portadores de DST/HIV/AIDS do Ministério da Saúde como Serviço de Assistência Especializada (SAE). Destaca-se ainda que o HEM atende cerca de 1600 pacientes todos os meses, sendo que 26% destes atendimentos são pacientes portadores de HIV/AIDS (FHEMIG, 2018; PREFEITURA DE BELO HORIZONTE, 2018).

Já a Santa Casa de Belo Horizonte (SCBH) está localizada no bairro Santa Efigênia e ocupa uma posição de destaque no cenário das entidades filantrópicas de saúde e no ensino médico. O Centro de Admissão e Diagnóstico Inicial (CADI) é considerado referência nacional, e realiza a maior parte dos atendimentos pelo SUS. A SCBH atende casos de média e alta complexidade, destacando-se como o maior hospital de transplantes de Minas Gerais. Por ano são realizadas 421 mil consultas e cerca de 40 mil internações (SANTA CASA, 2018).

Dessa forma, tendo em vista o atendimento especializado desses hospitais, sendo o HEM especializado no atendimento a pacientes portadores de HIV/ AIDS e a SCBH que realiza um grande número de transplantes, optou-se pela escolha dessas instituições para a coleta das amostras. O critério estabelecido foi o maior número de pacientes atendidos, especialmente indivíduos imunossuprimidos, visando assim, um maior número de amostras clínicas.

4.2 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética sob o número CAAE-61517816.8.0000.5149 (ANEXO 1). É importante ressaltar que todos os pacientes ou seus

responsáveis legais foram convidados a participar dessa pesquisa e receberam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO 2) e Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) (ANEXO 3) mediante explicação detalhada pelos membros da pesquisa. Nenhum paciente foi identificado nesse estudo ou em posteriores publicações geradas a partir dessa pesquisa.

4.3 Caracterização laboratorial

4.3.1 Coleta de amostras

Os espécimes clínicos foram coletados pelo setor de Microbiologia dos hospitais Eduardo de Menezes e Santa Casa de Belo Horizonte. Inicialmente foi realizado um exame micológico direto com tinta nanquim para um diagnóstico presuntivo dos isolados. Posteriormente, as amostras foram repicadas em ágar Sabouraud com cloranfenicol e encaminhadas ao Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.3.2 Processamento das amostras e criopreservação

Os isolados clínicos sugestivos de pertencerem ao gênero *Cryptococcus* spp. foram repicados em ágar Sabouraud com cloranfenicol. A seguir, os isolados foram inoculados em 2 mL de caldo GYMP e incubados por 24 -72 horas a 37°C. Após esse período, 850 µL de cada amostra foram transferidas para tubos criogênicos estéreis e posteriormente foi adicionado 150 µL de glicerol esterilizado. Os criotubos foram devidamente identificados e armazenados no freezer -80 para manter a viabilidade das amostras durante o período de pesquisa na Coleção de Culturas do Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos da Universidade Federal de Minas Gerais. As leveduras foram depositadas como biorrepositório, sendo confidenciais e tendo finalidade exclusiva para a pesquisa acadêmica e não poderão ser destinadas a terceiros.

4.3.3 Cultivo em ágar CGB (ágar canavanina-glicina-azul-de-bromotimol)

A diferenciação entre as espécies de *C. neoformans* e *C. gattii* foi realizada por meio do cultivo em meio CGB (KWON-CHUNG et al.,1982). O meio consiste de 880 mL de água destilada, 2 mL de solução B (0,4 g de azul de bromotimol e água destilada qsp 100mL) e 10 mL de solução A (10 g de glicina, KH_2PO_4 1g, MgSO_4 1g, cloridrato de tiamina 1mg, sulfato de L-canavanina 30 mg e água destilada qsp 100 mL).

O crescimento no meio CGB foi utilizado para diferenciar as espécies de *C. neoformans* e *C. gattii*. É sabido que *C. gattii* é resistente a L-canavanina, que é um aminoácido não-protéico análogo da L-arginina.

4.4 Identificação molecular

4.4.1 Extração do DNA total

A extração do DNA total foi realizada conforme o trabalho descrito por Ferrer e colaboradores (2001). Todas as identificações moleculares tiveram como cepas controle as linhagens de *C. neoformans* H99 e *C. gattii* ATCC24065.

Uma colônia do isolado foi repicada em ágar Sabouraud e incubada por 48 horas a 37°C. Após o crescimento, as colônias foram ressuspensas em 100 µL de tampão de lise [Tris-HCl 0,05M, EDTA 0,005M, NaCl 0,1M e SDS 1% (p/v)] e incubadas em banho-maria a 65°C por 45 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) aos tubos e os mesmos foram homogeneizados 20 vezes por inversão e centrifugados a 14.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta e transferido para outro tubo, ao qual foi adicionado (v/v) de isopropanol. Os tubos foram deixados em repouso à temperatura ambiente durante 15 minutos para precipitação do DNA.

Após essa etapa, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão, e ao *pellet* formado, foram acrescentados 200 µL de etanol 70%. Efetuou-se outra centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado por inversão e acrescentado novamente 200 µL de etanol 70%, seguido da centrifugação a 14.000 rpm. Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente *overnight* para evaporação completa do etanol. Após essa etapa, o DNA foi ressuspendido em 50µL de tampão Tris-EDTA 0,1M (TE) pH 8,0. Todos os produtos obtidos foram quantificados em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Thecnologies) e estocados a -20°C até a sua utilização.

4.4.2 Amplificação utilizando o iniciador (GTG)₅

Para confirmação do agrupamento genotípico das leveduras, os isolados foram submetidos à análise molecular, por meio de PCR utilizando-se o iniciador (GTG)₅ (5'-CTGGCTTGGTGTATG-3') de acordo com Meyer e colaboradores (1993). Cada reação de PCR foi realizada em um volume final de 25µL, contendo 2,5 µL de tampão de PCR 10X (Thermo Fisher Scientific), 1,5µL de MgCl₂ 1,5 M (Thermo Fisher Scientific), 1,0 µL de dNTP 10 mM, 2,0 µL do iniciador (GTG)₅ a 10 pmol/ µL (MWG Biotech), 100 a 250 ng de DNA e 0,2 µL de Taq DNA Polimerase 1,25 U/L (Thermo Fisher Scientific) e o volume final foi completado com água deionizada.

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o termociclador Eppendorf flexlid nexus SXle. O programa de ciclagem consiste de uma desnaturação inicial a 94° C por 2 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 93° C por 45 segundos, anelamento a 50° C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1 minuto, a extensão final a 72° C por 6 minutos. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) em tampão TBE 0,5 X (54 g de Tris-base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5M, pH 8,0).

Os amplicons foram previamente corados com solução de GelRed (Biotium, USA), visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, França). A comparação do perfil de bandas foi feita utilizando-se as linhagens controles CN55 (VNI), CN56 (VNII), CN57 (VNIII) e CN58 (VNIV) para *C. neoformans* e CG59 (VGI), CG60 (VGII), CG61 (VGIII) e CG62 (VGIV) para *C. gattii*. Os isolados que apresentaram padrões de bandas idênticos foram confirmados como pertencentes ao mesmo grupo. Um isolado de cada grupo molecular foi selecionado para sequenciamento dos domínios D1/D2 da subunidade maior do DNA ribossomal utilizando os iniciadores ITS1 e NL4.

4.4.3 Amplificação utilizando os iniciadores ITS1 e NL4

Os isolados foram submetidos ao sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA utilizando os iniciadores NL1 (GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) e NL4 (GGTCCGTGTTTCAAGACGG), segundo Lachance e colaboradores (1999). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo: 1,0 a 5,0 µL de DNA (variando de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50-500 ng/µL), 1,0 µL de cada iniciador NL1 e NL4 10 µmol-1, 5,0 µL de tampão de PCR 5X (Fermentas), 2,0 µL de MgCl₂

25 mM, 2,0 µL de dNTP 10 mM, 0,2 µL de Taq DNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água para injeção esterilizada.

As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Mastercycler (Eppendorf), sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por dois minutos, seguida por 35 ciclos de: desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 54°C por 25 segundos e extensão a 72°C por 20 segundos, seguida por extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (Pronadisa), em tampão TBE 0,5X, eluídos durante aproximadamente uma hora a 120 V. As bandas foram coradas com solução de GelRed (Biotium), e os géis visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, França).

4.4.4 Tipagem por sequenciamento multilocus (MLST)

A reação da PCR foi realizada conforme a descrição para a amplificação dos fragmentos dos loci CAP59, GPD1, LAC1, PLB1, SOD1, URA5 e IGS1 utilizados no consenso do ISHAM-MLST para *C. neoformans* /*C. gattii* (MEYER et al., 2009) (Tabela 2). A amplificação dos fragmentos pela PCR foi realizada com volume de 50 µL contendo 100 ng do DNA genômico, tampão de PCR 1x (Tris-HCl 10 mM ph 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM), 0,2 mM dos dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Introgen, Brasil), 2mM de MgCl₂, 3,0 U de Taq DNA polimerase (Introgen, Brasil) e 50 ng dos iniciadores direto e reverso para cada locus analisado. As reações de PCR foram realizadas no termociclador Mastercycler (Eppendorf).

Tabela 2 - Iniciadores e condições usadas na amplificação dos loci que foram sequenciados.

Alvo	Produto gênico	Sequência (5'3')	Condições de amplificação	Produto (pb)
CAP59	Proteína associada à cápsula	CAP59F 5'CTCTACGTCGAAGTCAAG3' CAP59R 5'TCCGCTGCAACAAGTGATACCC3'	94°C 3min; 35 ciclos: 94°C 30s, 56°C 30s, 72°C 1min	559
GPD1	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	GPD1F 5'CCACCGAACCCTTCTAGGATA3' GPD1R 5'CTTCTTGGACCTCCCTTGAG3'	94°C 3min; 35 ciclos: 94°C 45s, 63°C 1min, 72°C 2min	543
LAC1	Lacase	LAC1F 5'AACATGTTCCCTGGGCTGTG3' LAC1R 5'ATGAGAATTAATCGCCTGT3'	94°C 3min; 30 ciclos: 94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 1min	469
PLB1	Fosfolipase	PLB1F 5'CTTCAGGCGGAGAGAGGTTT3' PLB1R 5'GATTTGGCGTTGGTTTCAGT3'	94°C 3min; 35 ciclos: 94°C 30s, 52°C 30s, 72°C 1.5min	532

				(continuação)
Alvo	Produto gênico	Sequência (5'3')	Condições de amplificação	Produto (pb)
URA5	Orotidine monofosfato pirofosforilase	URA5F 5' ATGTCCTCCCAAGCCCTCGAC 3' URA5R 5' TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC 3'	94°C 3min; 35 ciclos: 94°C 45s, 63°C 1min, 72°C 2min	601
IGS1	Espaçador ribossomal intergênico	IGSF 5' ATCCTTTGCAGACGACTTGA 3' IGSR 5' GTGATCAGTGCATTGCATGA 3'	94°C 3min; 35 ciclos: 94°C 30s, 60°C 30s, 72°C 1min	723
SOD	Cu, Zn, Superóxido dismutase	SOD1CGF 5' GATCCTCACGCCATTACG 3' SOD1CGR 5' GAATGATGCGCTTAGTTGGA 3'	94°C 3min; 35 ciclos: 94°C 30s, 52°C 30s, 72°C 1.5min	700

Fonte: Adaptado de Meyer e colaboradores (2009).

4.4.5 Purificação dos amplicons

Os amplicons gerados pela reação de PCR foram purificados utilizando-se EDTA. Ao produto de PCR com volume de 47 µL foram adicionados 11,75 µL de EDTA 125 mM e 141 µL de etanol absoluto (Merck). Esta mistura foi submetida à centrifugação com rotação de 14.000 rpm durante 25 minutos. O sobrenadante foi descartado, e para lavagem do precipitado foi adicionado 120 µL de etanol 70%, sendo posteriormente homogeneizado por inversão.

Após, centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado novamente e o restante do etanol foi secado por 20 minutos a 37°C. O DNA foi então ressuscitado em 10 µL de água para injeção esterilizada. O produto obtido foi dosado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies) para ser utilizado nas reações de sequenciamento.

4.4.6 Reações de sequenciamento

As reações de sequenciamento dos produtos obtidos após a purificação dos amplicons foram realizadas no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular (LPCM) da FIOCRUZ/Instituto René Rachou, utilizando o kit Big Dye versão 3.1 (Applied Biosystems, EUA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado ABI 3730. A reação de sequenciamento foi realizada em microplacas de 96 poços (Applied 5 Biosystems, EUA) preparada para um volume final de 10 µL, em que foram adicionados: 1 µL do iniciador (5 µmol-1), 1 µL de tampão (presente no kit de sequenciamento), 1 µL de Big Dye, 1 a 5 µL de

DNA (de modo que a reação final contenha entre 15 e 20 ng) e o restante de água para injeção esterilizada para completar o volume, se necessário. O programa de ciclagem utilizado consistiu de uma desnaturação inicial a 36°C por um minuto, 36 ciclos de anelamento a 96°C por 15 segundos, seguido por 15 segundos de extensão a 50°C e quatro minutos de extensão final a 60°C.

Para precipitação das reações de sequenciamento, 1,0 µL de EDTA 125 mM, 1,0 µL de acetato de sódio 3M e 50 µL de etanol absoluto (Merck) foram adicionados em cada poço da placa de 96 poços. A placa foi submetida à agitação em vórtex e incubada por 15 minutos à temperatura ambiente.

Decorrido o período de incubação, a placa foi centrifugada por 45 minutos a 4.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado por inversão da placa. Em seguida, foram adicionados 100 µL de etanol 70% (Merck). A placa foi novamente centrifugada por 15 minutos a 4.000 rpm a 4°C e o sobrenadante descartado por inversão. Para remoção do excesso de etanol, a placa foi invertida sobre um papel absorvente, e submetida a um pulso em centrífuga a 900 rpm durante um segundo.

Na sequência, a placa foi mantida em repouso durante 20 minutos para evaporação do etanol residual. O DNA precipitado das amostras em cada poço foi então ressuspensionado em 10 µL de Formamida HI DI (Applied Biosystems, EUA). A placa foi armazenada a 4°C, protegida da luz, até injeção das amostras no sistema automatizado ABI 3730.

4.4.7 Análise dos resultados

O alinhamento e a análise de todas as sequências foram realizados no programa Mega 5.1. As sequências obtidas pelo sequenciamento com os *primers* ITS₁/NL₄ foram analisadas na plataforma GenBank Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Já as sequências obtidas pelo sequenciamento com o conjunto de 7 iniciadores utilizados no MLST foram analisadas por meio do banco de dados internacional de MLST (<http://mlst.mycologylab.org>).

4.5 Avaliação dos fatores de virulência

4.5.1 Produção de fosfolipase

A atividade de fosfolipase foi realizada de acordo com Chen e colaboradores (1997) usando o método semi-quantitativo em placa contendo gema de ovo. Dessa forma, 4% de gema

de ovo foram adicionados ao meio ágar Sabouraud dextrose (Difco) com 1M de cloreto de sódio e 5 mM de cloreto de cálcio. Foram plaqueados 2 µL de uma suspensão de leveduras contendo 10^8 células/ mL na superfície da placa. As placas foram incubadas por 10 dias a 35°C. A formação de zonas de precipitação (Pz) ao redor da colônia foram consideradas como indicativo da produção da enzima. A produção de fosfolipase foi expressa como uma taxa entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação, como descrito anteriormente. O valor médio de Pz de cada isolado foi obtido a partir de dois ensaios separados e em duplicata.

4.5.2 Produção de Proteinase

A atividade de proteinase foi realizada de acordo com Chen e colaboradores (1996). Preparou-se um meio sólido contendo 11,7g de albumina de soro bovino, 1,0g de extrato de levedura, e 2,0g de albumina de soro bovino em 100ml de água. O pH foi ajustado para 5,0 e o meio foi esterilizado por filtração e adicionado a uma solução de ágar esterilizada em autoclave (18g de ágar em 900ml de água destilada). Foram plaqueados 10µl de uma suspensão de 10^6 células/mL depositados sobre as placas. As placas foram incubadas por sete dias a 28 °C e a proteólise da albumina de soro bovino foi visualizada após a coloração com negro de amido (negro de amido, 1g; ácido acético glacial, 199ml; água destilada, 100ml). A atividade de proteinase foi classificada como negativa quando não houve formação de halo, +1, quando a proteólise ao redor da colônia estiver entre 1 e 2 mm e +2, no caso da descoloração do ágar exceder 3-5 mm ao redor da colônia.

4.5.3 Produção de urease

A habilidade do fungo de hidrolisar a ureia por ação da enzima urease foi verificada pela alcalinidade e resultado da viragem do indicador de pH. Para isso foi utilizado o meio ágar ureia (peptona 1 g, glicose 1 g, NaCl 5 g, KH_2PO_4 2 g, ureia 20 g, vermelho de fenol 0,012 g, ágar 18 g, água destilada qsp 1000mL, pH 6,8). As amostras foram semeadas em toda a superfície do meio, com subsequente incubação a 37°C e observação durante 7 dias. O resultado positivo foi evidenciado por meio da viragem do indicador presente no meio com a coloração amarela inicial para a cor rosa ou vermelho-violeta final, sendo a intensidade da coloração um indicativo do grau de hidrólise da ureia e atividade de urease (COX et al., 2000).

4.5.4 Produção de melanina

O meio ágar níger foi utilizado para avaliar a produção de melanina por *C. neoformans* e *C. gattii*. O ágar níger contém extrato de semente de *Guizotia abyssinica*. As amostras clínicas foram repicadas em ágar Sabouraud por 48 horas a 37°C. Posteriormente, as leveduras foram repicadas em meio ágar níger (sementes de níger 10g, glicose 0,1 g, ágar bacteriológico 2 g, cloranfenicol 0,2 g/L e água qsp 100 mL). Após 48-72 horas foi observado o aparecimento de colônias marrons indicando a presença de *Cryptococcus* spp. O aspecto das colônias foi determinado visualmente, sendo os isolados classificados de acordo com a intensidade de coloração das colônias. Isolados que apresentaram colônias claras foram classificados como fracamente positivos (+), isolados que apresentaram colônias de coloração média foram classificados como positivos (++) e isolados com colônias de coloração escura foram classificados como fortemente positivos (+++).

4.5.5 Termotolerância

A fim de verificar a habilidade de crescimento dos isolados a 37°C e 39°C foi realizado um ensaio de termotolerância de acordo com Gyawali e colaboradores (2017) com modificações. Foram preparados inóculos contendo 1×10^6 células/mL e plaqueados em ágar YPD. As placas foram incubadas a 37°C e 39°C e o crescimento foi analisado após 48h.

4.5.6 Ensaio de sobrevivência em modelo invertebrado

Para determinar a virulência de *Cryptococcus* spp. em modelo invertebrado, os 60 isolados do presente estudo foram testados na larva *Tenebrio molitor* seguindo a metodologia de Souza e colaboradores (2015) com modificações. As larvas de *Tenebrio molitor* foram adquiridas comercialmente, sendo utilizadas larvas de um mesmo lote para a realização dos testes. Para o ensaio foram selecionadas larvas pesando entre 100 e 200 mg com a cor uniforme e clara. Inicialmente foi realizada uma curva de sobrevivência com os isolados controle H99 e ATCC24065 nas concentrações 1×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 e 1×10^6 células/mL. A partir desse resultado, optou-se por realizar o experimento com todos os isolados analisados com uma suspensão de leveduras contendo 1×10^6 células/mL. Os inóculos foram preparados a partir da contagem em câmara de Neubauer. As larvas foram inoculadas utilizando-se uma seringa calibre com capacidade de 10 µL. A injeção foi realizada na hemocele, no segundo ou terceiro

esternito acima das pernas, na porção ventral (Figura 6A). Utilizou-se 4 grupos controles, sendo um grupo injetado apenas PBS, outro grupo que não recebeu injeção, e dois grupos infectados com as linhagens controle desse estudo, sendo um grupo infectado pelo *C. neoformans* H99 e outro pelo *C. gattii* ATCC24065. As larvas foram incubadas a 37°C em placas de Petri contendo dieta de cria e o número de larvas mortas foi registrado em intervalos de 24 horas durante 10 dias. Para estabelecer a morte das larvas foi observada visualmente a melanização, bem como, a resposta a estímulos físicos quando essas larvas eram tocadas levemente por uma pinça (Figura 6B). Os experimentos foram realizados em triplicata com grupos de 16 larvas por placa. Os resultados foram analisados GraphPad Prism 6 dispostos em uma curva de sobrevivência utilizando o método de Kaplan-Meier e análise estatística utilizando o teste de log-rank. O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

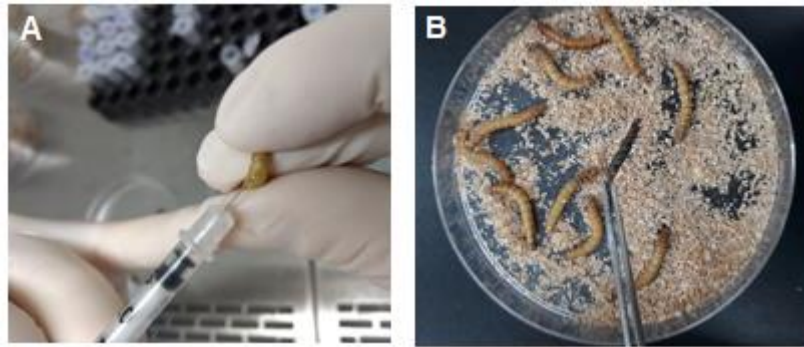


Figura 6 - Infecção em larvas de *Tenebrio molitor*. A) Inóculo foi injetado na hemocele na porção ventral. B) Observação de larva morta apresentando melanização característica. Fonte: LIMA, CM; 2019.

4.6 Determinação da Atividade Antifúngica

4.6.1 Teste de microdiluição em caldo

Os testes de concentração inibitória mínima (CIM) foram realizados seguindo as orientações prescritas no CLSI, protocolo M-27-A3 (CLSI, 2008). Para a realização desse teste foram utilizados os seguintes antifúngicos: anfotericina B (8 µg/mL-0.03 µg/mL), itraconazol (16 µg/mL-0.03 µg/mL), fluconazol (64 µg/mL-0.12 µg/mL) e voriconazol (16 µg/mL-0.03 µg/mL) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) foi utilizado para preparar as soluções estoque dos fármacos, exceto o fluconazol que foi dissolvido em água estéril. Todo o processamento da anfotericina B foi protegido da luz com papel alumínio, tendo em vista a fotossensibilidade da mesma.

As diluições seriadas foram realizadas em meio RPMI 1640 suplementado com 0,5% de glicose e adição de MOPS 0,165 mol/L. Posteriormente 100 µL de cada diluição foi distribuída em microplacas de 96 poços (Difco Laboratories, EUA). O controle de crescimento do microrganismo foi constituído de 100 µL do inóculo da levedura mais 100 µL de RPMI, e o controle de esterilidade apenas com o meio de cultura. Após a preparação das placas, todos os poços das diluições e controles, com exceção do controle negativo, receberam 100 µL do inóculo fúngico. As linhagens de *Cryptococcus* ATCC24065 e H99 foram utilizadas como controle.

Todos os ensaios foram realizados em duplicata e repetidos três vezes. As placas foram incubadas a 35°C durante 72 horas e a leitura foi realizada visualmente. Para a anfotericina B, a CIM foi considerada como a inibição total do crescimento quando comparado ao crescimento do controle. Para a leitura do fluconazol, itraconazol e voriconazol foi considerada a inibição de 90% do crescimento quando comparado ao crescimento do controle. A interpretação dos valores de CIM foi realizada de acordo com as diretrizes do documento M27-A3, CLSI 2008. Os isolados que apresentaram valores de CIM >1 µg/mL frente a anfotericina B, foram considerados resistentes. Para o fluconazol, linhagens que apresentaram valores de CIM ≤ 8 µg/mL foram consideradas sensíveis, valores de CIM entre 16-32 µg/mL foram consideradas sensibilidade dose-dependente e valores de CIM ≥64 µg/mL foram consideradas resistentes. Em relação ao itraconazol, os isolados que apresentaram valores de CIM ≤ 0.125 µg/mL foram considerados sensíveis, valores de CIM entre 0.25-0.5 µg/mL foram considerados sensibilidade dose-dependente e valores de CIM ≥ 1.0 foram considerados resistentes. Para o voriconazol, os isolados que apresentaram valores de CIM ≤ 1.0 µg/mL foram considerados sensíveis e valores de CIM ≥ 4.0 µg/mL foram considerados resistentes. Esse ensaio foi realizado com todos os isolados de *Cryptococcus* spp. do presente estudo.

4.7 Caracterização Epidemiológica

O levantamento dos dados clínicos dos pacientes foi realizado por meio de consulta aos prontuários médicos enviados pelo setor de Micologia dos hospitais Eduardo de Menezes e Santa Casa de Belo Horizonte. As variáveis analisadas foram sexo, idade, presença de doenças de base e local onde residia o paciente. Foram utilizadas 60 fichas médicas dos pacientes internados com criptococose, excluindo-se das análises os casos em que havia mais de um isolado por paciente. Ressalta-se que em algumas análises o n variou devido à falta de dados completos, uma vez que nem todos os prontuários estavam devidamente preenchidos.

4.8 Análise Estatística

Todos os dados foram analisados usando o programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA). O teste de comparação múltipla Newman-Keuls foi empregado para comparação entre os grupos experimentais. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização das amostras clínicas

No presente estudo foram obtidos 60 isolados provenientes de 60 pacientes internados nos hospitais Eduardo de Menezes e Santa Casa de Belo Horizonte. Os dados dessas amostras encontram-se na Tabela 3, onde consta a origem do sítio de isolamento e a identificação geral. Nota-se que 88.3% (53/60) das amostras foram isoladas do líquido, 8.3% (5/60) do sangue e apenas 3.3% (2/60) do lavado bronco alveolar. Observa-se ainda que 93.3% (56/60) das amostras foram identificadas como *C. neoformans* e 6.7% (4/60) foram identificadas como *C. gattii* a partir do resultado preliminar no meio CGB.

Tabela 3 - Código, sítio de origem e caracterização inicial das 60 amostras clínicas.

CÓDIGO	ORIGEM	ID	CÓDIGO	ORIGEM	ID
36765	Sangue	CN	1912	LCR	CN
53131	LCR	CN	1985	LCR	CN
51721	LCR	CN	2025	LCR	CN
47873	LCR	CN	2614	LCR	CG
30645	LCR	CN	2925	LCR	CN
1806	LCR	CN	8950	LCR	CN
57383	LCR	CN	7533	LCR	CN
3191	Sangue	CN	5985	LCR	CN
1265	LCR	CN	5197	LCR	CN
1045	LCR	CN	1416	LCR	CN
1048	LCR	CN	1820	LCR	CG
1069	LCR	CN	4662	LCR	CN
1085	LCR	CN	4892	LCR	CN
50467	LCR	CN	4886	LCR	CN
1870	Sangue	CN	4602	LCR	CN
26283	LCR	CN	4578	LCR	CN
27951	LCR	CN	4652	LCR	CN
31015	LCR	CN	4371	LCR	CN
31104	LCR	CN	114	LCR	CN
1865	LCR	CN	1742	LCR	CN
17446	LCR	CN	460	LCR	CG
1716	LCR	CN	568	LCR	CN
1653	LCR	CN	580	LCR	CN
1635	LCR	CN	818	LCR	CN
2930	LCR	CN	4134	LCR	CN
291	LCR	CN	909	LCR	CN
307	LCR	CN	486	LCR	CN
540	LCR	CN	350	LCR	CN
2718	LCR	CG	390	LCR	CN
452	LCR	CN	314	LCR	CN

ID= Identificação; CN=*Cryptococcus neoformans*; CG=*Cryptococcus gattii*; LCR= Líquor BAL=Lavado Bronco Alveolar

5.2 Identificação molecular

A identificação genotípica dos isolados de *Cryptococcus* foi realizada utilizando o *primer* (GTG)₅. A comparação do perfil de bandas foi feita utilizando-se as linhagens controles VNI, VNII, VNIII e VNIV para *C. neoformans* e VGI, VGII, VGIII e VGIV para *C. gattii*. Após o agrupamento dos isolados, foi realizado o sequenciamento região D1/D2 da subunidade maior do rDNA utilizando o *primer* ITS1 a fim de se confirmar os resultados da PCR *fingerprint*.

Com base nos dados de agrupamento e sequenciamento foram obtidos três diferentes padrões de bandas: VNI, VNII e VGII. Identificou-se que 96.4% (54/56) dos isolados identificados inicialmente como *C. neoformans* apresentavam o genótipo VNI (*C. neoformans*) e apenas 3.6% (2/56) apresentavam o genótipo VNII (*C. neoformans*). Estes isolados foram identificados como *C. neoformans* var. *grubii*, sorotipo A na análise pelo BLAST. Em relação as 4 amostras identificadas anteriormente como *C. gattii*, todas pertenciam ao genótipo VGII (*C. deuterogattii*) (Tabela 4).

Tabela 4 - Identificação dos isolados de *Cryptococcus* spp. pela técnica de PCR *fingerprint*.

Espécie	Genótipo	n	%
<i>C. neoformans</i>	VNI	54	90
<i>C. neoformans</i>	VNII	2	3.3
<i>C. deuterogattii</i>	VGII	4	6.7
Total		60	100

A técnica molecular de MLST foi realizada de acordo com o Consenso proposto por Meyer e colaboradores (2009) utilizando um conjunto de 7 iniciadores (CAP59, URA5, IGS1, PLB1, SOD1, GPD1, LAC1). O sequenciamento multilocus foi realizado com todos os isolados do presente estudo (Tabela 5). Contudo, devido a inconsistências em alguns genes (seja no sequenciamento, no alinhamento de *primers* ou na diferença dos genes com o banco de dados), não foi possível determinar as sequências tipo (ST). O gene GPD1 foi o que apresentou o maior número de alelos não determinados e o gene CAP59 o que apresentou o menor número de dados inconclusivos.

Tabela 5 - Identificação de alelos de *Cryptococcus* pelo sequenciamento multilocus (MLST).

Amostra	Espécie	GM	CAP 59	URA 5	PLB 1	IGS 1	LAC 1	SOD 1	GPD 1
36765	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	2	ND	3	ND	1
53131	<i>C. neoformans</i>	VNI	7	1	1	10	ND	1	1
51721	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	4	ND	ND	1	ND
47873	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	4	10	ND	1	ND
30645	<i>C. neoformans</i>	VNI	13	26	15	23	ND	ND	ND
1806	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	4	ND	ND	1	ND
57383	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	2	ND	3	ND	ND
3191	<i>C. neoformans</i>	VNI	7	2	1	1	ND	1	ND
1265	<i>C. neoformans</i>	VNI	7	2	1	1	ND	1	ND
1045	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	2	10	ND	1	ND
1048	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	4	10	3	ND	ND
1069	<i>C. neoformans</i>	VNI	7	1	1	10	ND	1	1
1085	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	2	ND	ND	1	ND
50467	<i>C. neoformans</i>	VNI	7	1	1	10	ND	1	1
1870	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	ND	1	ND	1	ND
26283	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	4	ND	3	ND	ND
27951	<i>C. neoformans</i>	VNI	7	ND	1	1	ND	1	1
31015	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	4	ND	3	1	ND
31104	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	ND	10	3	1	ND
1865	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	ND	10	3	1	ND
1912	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	ND	10	ND	ND	ND
2025	<i>C. neoformans</i>	VNI	7	1	1	1	ND	1	1
2925	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	2	ND	ND	1	1
8950	<i>C. neoformans</i>	VNI	7	1	1	1	ND	ND	1
7533	<i>C. neoformans</i>	VNI	ND	ND	4	ND	ND	1	ND
5985	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	ND	10	ND	1	ND
5197	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	4	10	ND	1	23
1416	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	ND	ND	10	ND	ND	ND
4662	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	4	ND	ND	1	ND
4892	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	4	10	ND	1	23
4886	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	ND	10	1	3	ND
4602	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	4	10	ND	ND	ND
4578	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	37	4	10	ND	1	ND
4652	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	2	10	3	1	ND
4371	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	4	10	3	ND	ND
114	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	ND	2	10	ND	1	ND
1742	<i>C. neoformans</i>	VNI	7	1	ND	1	ND	1	ND
1746	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	ND	ND	ND	1	ND
1716	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	ND	ND	3	1	ND
1653	<i>C. neoformans</i>	VNI	ND	1	ND	ND	ND	1	1
1635	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	4	10	ND	1	ND
2930	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	ND	ND	ND	1	ND
291	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	4	ND	ND	1	23
307	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	4	ND	ND	1	23

(continuação)

Amostra	Espécie	GM	CAP 59	URA 5	PLB 1	IGS 1	LAC 1	SOD 1	GPD 1
540	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	4	10	3	1	ND
314	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	ND	1	ND	ND	ND
452	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	2	ND	5	1	ND
568	<i>C. neoformans</i>	VNI	7	1	1	10	ND	1	1
580	<i>C. neoformans</i>	VNI	7	1	1	1	ND	1	1
818	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	ND	ND	ND	1	ND
909	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	2	10	3	ND	ND
486	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	4	10	ND	1	23
350	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	1	ND	ND	3	1	ND
390	<i>C. neoformans</i>	VNI	7	1	ND	1	ND	1	ND
4134	<i>C. neoformans</i>	VNII	7	4	11	14	8	ND	9
1985	<i>C. neoformans</i>	VNII	2	4	11	ND	8	12	ND
2614	<i>C. deuterogattii</i>	VGII	3	2	9	15	4	ND	16
1820	<i>C. deuterogattii</i>	VGII	ND	2	9	15	4	ND	16
2718	<i>C. deuterogattii</i>	VGII	26	2	2	ND	ND	58	6
460	<i>C. deuterogattii</i>	VGII	38	2	2	53	21	ND	ND

ND: Não Determinado

As análises de frequência foram realizadas excluindo-se os alelos que não foram identificados. Com base nas regiões sequenciadas, obteve-se de 4 a 7 tipos de alelos, sendo que o gene CAP59 apresentou maior variabilidade e o gene SOD1 o que menos variou (Tabela 6). A partir da análise do gene CAP59, observa-se que foram identificados 7 alelos, sendo o alelo 1 encontrado em 39 isolados. O gene URA5 apresentou um total de 5 alelos sendo que o alelo 1 foi o mais frequente. O gene PLB1 demonstrou um total de 6 alelos, sendo o alelo 2 o mais encontrado. A região IGS1 apresentou 6 tipos de alelos sendo o alelo 10 identificado em 24 isolados. Em relação ao gene LAC1 identificou-se 6 alelos tendo sido mais frequente o alelo 3. No gene SOD1 foram identificados apenas 4 alelos e o alelo 1 foi o mais identificado. O gene GPD1 apresentou 5 alelos, com o alelo 1 sendo o mais frequente.

Tabela 6 - Genes sequenciados com o total de alelos e alelos mais frequentes.

Gene	Número de alelos identificados	Alelos mais frequentes	Frequência Alélica
CAP59	7	1 (39 isolados)	0.684
URA5	5	1 (46 isolados)	0.821
PLB1	6	2 (11 isolados)	0.25
IGS1	6	10 (24 isolados)	0.615
LAC1	6	3 (13 isolados)	0.65
SOD1	4	1 (41 isolados)	0.931
GPD1	5	1 (11 isolados)	0.55

5.3 Avaliação dos fatores de virulência

A atividade da enzima proteinase foi observada em 96.6% (58/60) das amostras analisadas, e em apenas dois isolados não foi detectada atividade. Destaca-se que os dois isolados que não apresentaram atividade, foram identificados como *C. neoformans* genótipo VNI (códigos 452 e 314). Em relação a atividade da enzima fosfolipase, observou-se que 5.0% (3/60) dos isolados não apresentaram atividade. Os três isolados que não tiveram atividade também foram identificados como *C. neoformans* genótipo VNI (códigos 1742, 1635 e 7533) (Tabela 7). Não houve diferenças estatisticamente significantes na produção dessas enzimas em relação aos diferentes tipos moleculares analisados. A habilidade de crescimento a 37°C e 39°C foi observada em todos os isolados analisados, sendo semelhante o crescimento em ambas as temperaturas testadas.

Tabela 7 - Produção de proteinase e fosfolipase pelos isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. separados por genótipos

Espécie	GM	Proteinase		Fosfolipase		Total
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
<i>C. deuterogattii</i>	VGII	4	0	4	0	4
<i>C. neoformans</i>	VNI	52	2	51	3	54
<i>C. neoformans</i>	VNII	2	0	2	0	2
Total		58	2	57	3	60

GM=Grupo molecular

A produção melanina foi observada em todos os isolados, destaca-se ainda que 35% (21/60) das amostras analisadas apresentaram placas muito escurecidas, sendo esses isolados classificados como fortemente positivos. Os isolados que tiveram uma coloração média foram classificados como positivos. Todos os 4 isolados de *C. deuterogattii* foram classificados como positivos. Apenas um isolado *C. neoformans* VNII (código 4134) foi classificado como fortemente positivo (Tabela 8). A produção de urease foi verificada em 96.6% (58/60) dos isolados com a metodologia usada no presente estudo. Os dois isolados que não produziram urease foram identificados como *C. neoformans* genótipo VNI (código 390 e 568).

Tabela 8 - Produção de Melanina pelos isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. separados por genótipos.

Espécies	GM	Melanina		Total
		Fortemente positivo	Positivo	
<i>C. deuterogattii</i>	VGII	0	4	4

(continuação)				
<i>C. neoformans</i>	VNI	20	34	54
<i>C. neoformans</i>	VNII	1	1	2
Total		21	39	60

GM=Grupo molecular

5.3.1 Sobrevida em tenébrios

A sobrevida em modelo invertebrado foi realizada com larvas do besouro *Tenebrio molitor* infectadas com diferentes concentrações de inóculos (1×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 e 1×10^6 leveduras/ larva). Inicialmente a infecção foi realizada apenas com as duas linhagens padrão de *Cryptococcus neoformans* H99 e *C. gattii* ATCC24065 (Figura 7). Os grupos PBS e não infectados foram os controles do experimento. Com base na comparação da sobrevida nas 4 diferentes concentrações, optou-se por realizar a infecção de todos os isolados com a concentração 1×10^6 leveduras/ larva, pois foi o único inóculo que diferiu estatisticamente do grupo PBS e controle não infectados ($p < 0.0001$) (Figura 7).

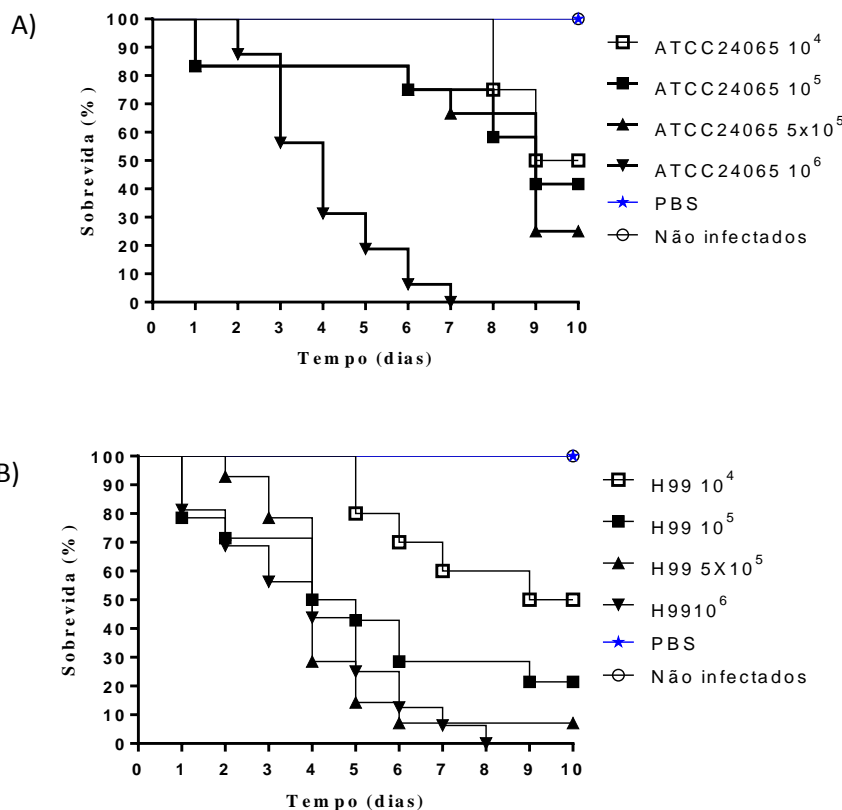


Figura 7 - Curvas de sobrevida de larvas de *Tenebrio molitor* em diferentes concentrações. A) Larvas infectadas com linhagem ATCC24065 nas concentrações 1×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 e 1×10^6 leveduras/larva. B) Larvas infectadas com a linhagem H99 nas concentrações 1×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 e 1×10^6 leveduras/larva.

As curvas de sobrevida dos isolados testados estão representadas na figura 8, separados em grupos de 10 isolados para facilitar a visualização. A análise estatística foi realizada

individualmente para cada linhagem. Todos os 60 isolados testados foram capazes de matar as larvas diferindo significativamente da sobrevivência das larvas que receberam apenas PBS ($p < 0.0001$).

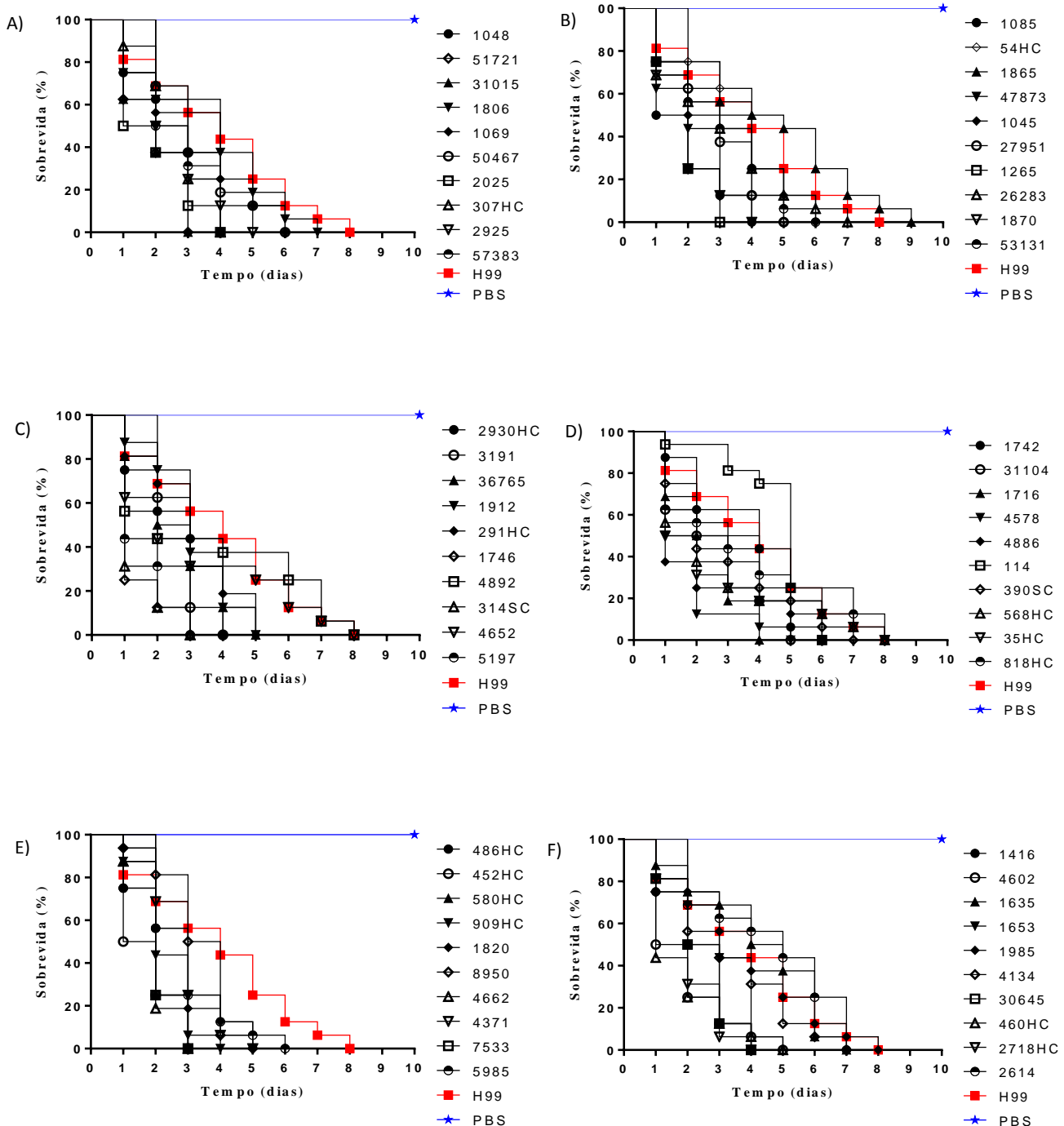


Figura 8 - Curvas de sobrevivência de larvas de *Tenebrio molitor*. A) Isolados 1048, 51721, 31015, 1806, 1069, 50467, 2025, 307, 2925 e 57383. B) Isolados 1085, 540, 1865, 47873, 1045, 27951, 1265, 26283, 1870 e 53131. C) Isolados 2930, 3191, 36765, 1912, 291, 1746, 4892, 314, 4652 e 5197. D) Isolados 1742, 31104, 1716, 4578, 4886, 114, 390, 568, 350 e 818. E) Isolados 486, 452, 580, 909, 1820, 8950, 4662, 4371, 7533 e 5985. F) Isolados 1416, 4602, 1635, 1653, 1985, 4134, 30645, 460, 2718 e 2614. As curvas foram comparadas usando o teste Log-rank (Mantel-Cox) Test e valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos.

Comparando a virulência do isolado *C. neoformans* H99 e os isolados identificados como *C. neoformans* desse estudo, nota-se que 50% (28/56) foram considerados mais virulentos, ou seja, mataram mais rapidamente as larvas do que o isolado *C. neoformans* H99 (Tabela 9). Destaca-se que dentre as 28 linhagens que foram consideradas mais virulentas, todas pertenciam a espécie *C. neoformans* (VNI). Os dois isolados de *C. neoformans* genótipo VNII identificados no presente estudo apresentaram menor virulência em relação ao isolado controle *C. neoformans* H99. A média de sobrevivência entre os isolados de *C. neoformans* variou de 1 a 3 dias. A comparação das amostras de *C. deuterogattii* genótipo VGII com o isolado *C. gattii* ATCC 24065 revelou que 75% (3/4) dos isolados foram considerados mais virulentos que a linhagem controle. A média de sobrevivência entre os isolados de *C. deuterogattii* variou entre 1 a 2 dias (Tabela 10).

Tabela 9 – Média de sobrevivência dos isolados clínicos de *C. neoformans* mais virulentos em modelo de larva de *Tenebrio molitor*.

Amostra	Espécie	Genótipo	Média sobrevivência (dias)	Valor p
1048	<i>C. neoformans</i>	VNI	3	0.0304
51721	<i>C. neoformans</i>	VNI	2	0.0019
31015	<i>C. neoformans</i>	VNI	2	0.0019
2025	<i>C. neoformans</i>	VNI	1.5	0.0022
307	<i>C. neoformans</i>	VNI	3	0.0275
57383	<i>C. neoformans</i>	VNI	2.5	0.0325
1085	<i>C. neoformans</i>	VNI	1.5	0.0045
47873	<i>C. neoformans</i>	VNI	2	0.0040
1265	<i>C. neoformans</i>	VNI	2	0.0016
1870	<i>C. neoformans</i>	VNI	2	0.0025
2930	<i>C. neoformans</i>	VNI	3	0.0358
3191	<i>C. neoformans</i>	VNI	3	0.0211
36765	<i>C. neoformans</i>	VNI	2.5	0.0393
1746	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	<0.0001
314	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	<0.0001
5197	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	0.0007
1716	<i>C. neoformans</i>	VNI	2.5	0.0079
4578	<i>C. neoformans</i>	VNI	1.5	0.0021
4886	<i>C. neoformans</i>	VNI	1	0.0458
486	<i>C. neoformans</i>	VNI	3	0.0078
452	<i>C. neoformans</i>	VNI	1.5	0.0006
580	<i>C. neoformans</i>	VNI	2	0.0027
909	<i>C. neoformans</i>	VNI	2	0.0065
4662	<i>C. neoformans</i>	VNI	2	0.0021
7533	<i>C. neoformans</i>	VNI	2	0.0044
1416	<i>C. neoformans</i>	VNI	2.5	0.0071
4602	<i>C. neoformans</i>	VNI	1.5	0.0027
30645	<i>C. neoformans</i>	VNI	2.5	0.0083

Tabela 10 – Média de sobrevivência dos isolados clínicos de *C. deuterogattii* mais virulentos em modelo de larva de *Tenebrio molitor*.

Amostra	Espécie	Genótipo	Média sobrevivida (dias)	Valor p
1820	<i>C. deuterogattii</i>	VGII	2	0.0057
460	<i>C. deuterogattii</i>	VGII	1	<0.0001
2718	<i>C. deuterogattii</i>	VGII	2	0.0002

5.4 Susceptibilidade antifúngica

A susceptibilidade antifúngica dos isolados clínicos de *Cryptococcus* foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo utilizando os antifúngicos fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B. Os resultados de Concentração Inibitória Mínima (CIM) estão representados na tabela 11.

Tabela 11 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos isolados de *Cryptococcus* spp frente aos antifúngicos usuais.

Código	Identificação	Concentração inibitória mínima (µg/ml)				
		GM	FLC	ITC	VOR	AMB
36765	<i>C. neoformans</i>	VNI	16	1	0.12	1
53131	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	0.25	<0.03	0.5
51721	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	0.5	0.12	1
47873	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	1	<0.03	0.5
30645	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	1	<0.03	0.5
1806	<i>C. neoformans</i>	VNI	4	0.5	0.06	1
57383	<i>C. neoformans</i>	VNI	16	1	0.12	1
3191	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	0.5	0.06	0.5
1265	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	0.25	0.12	0.25
1045	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	0.5	0.06	0.5
1048	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	0.5	0.06	0.5
1069	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	0.5	0.06	0.5
1085	<i>C. neoformans</i>	VNI	4	0.12	<0.03	0.12
50467	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	0.5	<0.03	1
1870	<i>C. neoformans</i>	VNI	2	0.12	<0.03	1
26283	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	0.5	<0.03	0.5
27951	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	0.5	0.06	1
31015	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	0.5	<0.03	1
31104	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	0.5	<0.03	0.25
1865	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	0.5	0.06	1
1912	<i>C. neoformans</i>	VNI	4	0.25	<0.03	0.5
2025	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	0.5	0.06	1
2925	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	1	0.06	1
8950	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	1	<0.03	0.25
7533	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	0.5	<0.03	0.5
5985	<i>C. neoformans</i>	VNI	2	0.25	<0.03	0.12
5197	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	0.5	0.06	0.12
1416	<i>C. neoformans</i>	VNI	4	0.25	0.06	0.12

(continuação)

Concentração inibitória mínima (µg/ml)						
Código	Identificação	GM	FLC	ITC	VOR	AMB
4662	<i>C. neoformans</i>	VNI	4	0.12	0.06	0.25
4892	<i>C. neoformans</i>	VNI	4	0.12	0.06	0.12
4886	<i>C. neoformans</i>	VNI	4	0.12	<0.03	0.12
4602	<i>C. neoformans</i>	VNI	4	0.25	0.06	0.12
4578	<i>C. neoformans</i>	VNI	2	0.12	0.06	0.12
4652	<i>C. neoformans</i>	VNI	4	0.12	0.06	0.12
4371	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	0.5	<0.03	1
114	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	1	<0.03	1
1742	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	0.5	<0.03	0.5
1746	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	0.5	<0.03	0.5
1716	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	0.5	<0.03	0.5
1653	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	0.5	<0.03	0.25
1635	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	0.5	<0.03	0.5
2930	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	1	<0.03	1
291	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	1	0.06	1
307	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	1	<0.03	1
540	<i>C. neoformans</i>	VNI	4	0.25	0.06	1
452	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	0.5	0.06	0.5
568	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	0.5	0.06	0.5
580	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	0.5	0.12	0.5
818	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	0.5	0.12	0.5
909	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	0.5	0.12	0.5
486	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	0.5	0.12	0.5
350	<i>C. neoformans</i>	VNI	8	0.5	0.06	0.5
390	<i>C. neoformans</i>	VNI	16	0.5	0.12	0.12
314	<i>C. neoformans</i>	VNI	16	1	0.25	1
1985	<i>C. neoformans</i>	VNII	8	0.5	<0.03	0.25
4134	<i>C. neoformans</i>	VNII	2	0.25	<0.03	0.5
2614	<i>C. deuterogattii</i>	VGII	16	2	0.12	1
2718	<i>C. deuterogattii</i>	VGII	8	1	0.06	0.5
460	<i>C. deuterogattii</i>	VGII	8	2	0.25	0.5
1820	<i>C. deuterogattii</i>	VGII	8	0.5	0.25	0.12
MIC ₅₀			8	1	0.12	1
MIC ₉₀			16	2	0.25	1

GM: Grupo Molecular, FLC: fluconazol, ITC: itraconazol, VOR: voriconazol e AMB: anfotericina B.

Conforme a tabela acima podemos observar que os valores de CIM frente ao fluconazol variaram de 2.0 a 16 µg/ml entre os isolados. Com relação ao itraconazol os valores de CIM encontrados variam de 0.12 a 2.0 µg/ml. Os valores de CIM frente a anfotericina B variaram de 0.12 a 1.0 µg/ml. Já para o voriconazol observou-se os menores valores de CIM entre os antifúngicos testados, sendo que as concentrações variaram de <0.003 a 0.25 µg/ml.

Os valores de CIM₅₀ para o fluconazol e itraconazol (8.0 µg/ml e 0.5 µg/ml respectivamente) foram semelhantes entre os isolados dos genótipos VNI e VNII. Os valores de CIM₉₀ foram maiores no genótipo VNI do que no VNII, com o genótipo VNI apresentando valores de 16 µg/ml para o fluconazol, 0.25 µg/ml para o voriconazol e 1.0 µg/ml para o

itraconazol e anfotericina B. Para o VNII, os valores de CIM₉₀ foram de 8.0 µg/ml para o fluconazol, <0.03 µg/ml para o voriconazol e 0.5 µg/ml para o itraconazol e anfotericina B. Em relação aos isolados identificados pertencentes ao genótipo VGII, os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ do fluconazol e anfotericina B foram idênticos aos valores encontrados para os isolados do genótipo VNI. O CIM₅₀ para o itraconazol e voriconazol foi maior comparado aos genótipos VNI e VNII com valores de 2.0 µg/ml para o itraconazol e 0.25 µg/ml para o voriconazol.

O perfil de susceptibilidade antifúngica geral está representado na tabela 12. Observa-se que 26.6% dos isolados foram resistentes ao itraconazol (CIM ≥ 1.0 µg/mL) e 60% apresentaram sensibilidade dose-dependente (CIM entre 0.25 e 0.5 µg/mL). Para o fluconazol, 10% dos isolados apresentaram sensibilidade dose-dependente (CIM entre 16 e 32 µg/mL). Em relação à anfotericina B e voriconazol nota-se que todos os isolados foram considerados sensíveis.

Tabela 12 – CIM₅₀ e CIM₉₀ dos isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. frente aos antifúngicos usuais.

Espécie	GM	FLZ (µg/mL)		ITZ(µg/mL)		VOR(µg/mL)		AMB(µg/mL)	
		MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀
<i>C. neoformans</i>	VNI	8.0	16.0	0.5	1.0	0.12	0.25	0.5	1.0
<i>C. neoformans</i>	VNII	8.0	8.0	0.5	0.5	<0.03	<0.03	0.5	0.5
<i>C. deuterogattii</i>	VGII	8.0	16.0	2.0	2.0	0.25	0.25	0.5	1.0

GM: Grupo Molecular, FLC: fluconazol, ITC: itraconazol, VOR: voriconazol e AMB: anfotericina B.

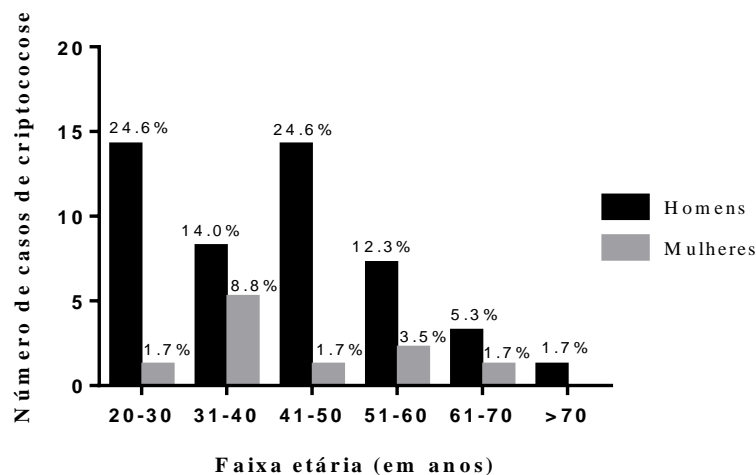
5.5 Caracterização epidemiológica

A análise dos dados dos pacientes foi realizada com base na consulta dos prontuários médicos disponibilizados. A idade ou data de nascimento estava indicada em 57 das 60 fichas analisadas. Com base nisso, a média geral de idade dos pacientes do presente estudo foi de 41.1 anos. As faixas etárias dos pacientes em que foram registrados o maior número de casos de criptococose foram entre 20 a 30 anos e 41 a 50 anos, ambas com 15 casos (26.3%), seguida pela faixa etária de 31 a 40 anos com 13 casos (22.8%), entre 51 a 60 anos houve 9 casos (15.8%), entre 61 a 70 anos houve 4 casos (7.0%) e acima de 70 anos apenas 1 caso (1.8%) registrado (Tabela 13).

Tabela 13 - Faixa etária dos pacientes com criptococose analisados no presente estudo.

Faixa etária	Indivíduos com criptococose	%
De 20 a 30 anos	15	26.3
De 31 a 40 anos	13	22.8
De 41 a 50 anos	15	26.3
De 51 a 60 anos	9	15.8
De 61 a 70 anos	4	7.0
> 70 anos	1	1.8

A maior parte dos pacientes acometidos pela criptococose analisados no presente estudo eram do sexo masculino, com 83.3% (50/60) dos casos e 16.7% (10/60) eram do sexo feminino. Na figura 9 está representada a correlação entre faixa etária e sexo dos pacientes. É possível observar que nos homens as faixas etárias com maior número de casos foram entre 20 a 30 anos e entre 41 a 50 anos. Nas mulheres, nota-se um perfil um pouco diferente, com um maior número de casos na faixa etária entre 31 a 40 anos.

**Figura 9** - Relação entre a faixa etária e sexo dos pacientes acometidos pela criptococose.

Em 53 das 60 fichas analisadas estavam identificadas as variáveis clínicas de cada paciente. Na tabela 14 estão representadas as frequências de criptococose dos pacientes de acordo com as variáveis clínicas e sexo. Observa-se que 78.3% dos pacientes com criptococose eram HIV positivos e 5% passaram por algum tipo de transplante. Apenas 1.6% dos indivíduos apresentaram lúpus, diabetes ou câncer, sendo relatado um único caso de cada uma dessas doenças. Convém ressaltar que entre os pacientes identificados como HIV positivos, 29.8% (14/47) evoluíram para óbito, o que representa uma elevada taxa de mortalidade. Desses 14 pacientes que evoluíram para óbito, 13 pertenciam ao genótipo VNI e 1 ao genótipo VNII. Em

3 casos, os pacientes foram transferidos para outros hospitais, contudo, não foi possível ter acesso aos dados desses indivíduos após a transferência.

Tabela 14 - Frequência percentual de criptococose de acordo com as variáveis clínicas e sexo.

Variáveis clínicas	Homem		Mulher		Total	
	n	%	n	%	n	%
HIV	40	66.6	7	11.6	47	78.3
Diabetes	1	1.6	0	0	1	1.6
Lúpus	0	0	1	1.6	1	1.6
Transplante	1	1.6	2	3.3	3	5
Câncer	1	1.6	0	0	1	1.6
NI	7	11.6	0	0	7	11.7

NI=Não informado

Os pacientes encaminhados aos hospitais colaboradores eram provenientes de variadas cidades do estado de Minas Gerais. Em 73.3% dos prontuários (44/60), estavam preenchidos os dados em relação a residência do paciente. O mapa representado na figura 10 representa as cidades de origem desses indivíduos. Foram identificadas amostras de pacientes das cidades de Morada Nova de Minas (1), Pompéu (1), São José da Lapa (1), Bom Despacho (1), São Joaquim de Bicas (1), Brumadinho (1), Pedro Leopoldo (1), Vespasiano (1), Sabará (1), Paraopeba (2), Sarzedo (2), Santa Luzia (2), Betim (3), Sete Lagoas (5), Contagem (5) e Belo Horizonte (16). Salienta-se que uma das amostras identificadas como genótipo VNII foi proveniente da cidade de Bom Despacho e duas das amostras identificadas como genótipo VGII foram provenientes das cidades de Santa Luzia e Belo Horizonte. As amostras provenientes das outras cidades citadas acima foram identificadas como genótipo VNI. Observa-se que 36.3% (16/44) das amostras foram de pacientes que residiam na cidade de Belo Horizonte. Infelizmente, não foi possível identificar a origem de dois isolados do genótipo VGII e uma amostra do genótipo VNII. Dessa forma, é possível observar que 16 amostras do presente estudo não puderam ser rastreadas devido à falta de dados no prontuário médico.

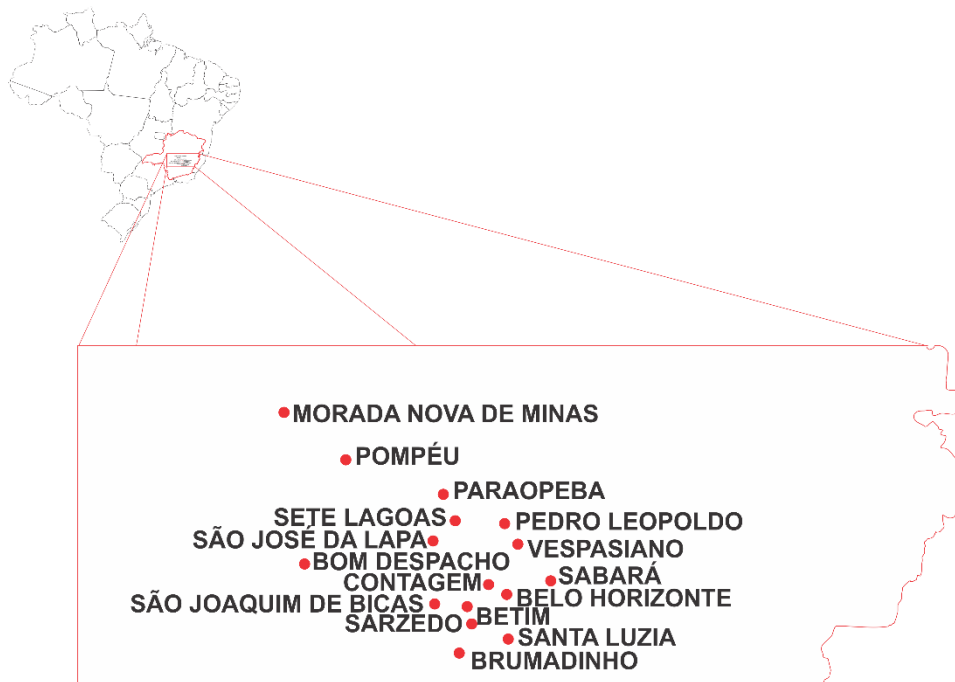


Figura 10 - Mapa de Minas Gerais mostrando a distribuição das amostras de *Cryptococcus* spp. Fonte: LIMA, C. M.;2019.

6 DISCUSSÃO

Em muitas regiões do mundo tem sido amplamente estudada a caracterização molecular das espécies de *Cryptococcus* (MONTAGNA et al., 2018; DOU et al., 2017; COGLIATI et al., 2013; LITVINTSEVA et al., 2006). A importância do estudo epidemiológico ocorre como forma não apenas de se conhecer as linhagens circulantes, mas como também monitorar e assim evitar possíveis surtos, bem como compreender a estrutura genética da população de *Cryptococcus* (FERREIRA-PAIM et al., 2017, DEL-POETA et al. 2012).

Em 2013, Cogliati e colaboradores realizaram um trabalho pioneiro sobre a epidemiologia molecular de *Cryptococcus* a partir de dados publicados com mais de 68.000 amostras de várias regiões do mundo, no qual se constatou que o tipo molecular com maior prevalência mundial era o *C. neoformans* VNI. Além disso, alguns autores afirmaram que a infecção pelos genótipos de *C. neoformans* é muito mais frequente que as causadas pelos genótipos de *C. gattii* (MEYER et al. 2011).

No Brasil, a distribuição dos tipos moleculares foi realizada a partir da análise de trabalhos publicados anteriormente e de isolados presentes em coleções de microorganismos, que mostrou uma distribuição similar a descrita mundialmente, com maior prevalência de isolados VNI (64%), seguido por VGII (21%), VNII (5%), VGIII (4%), VGI e VNIV (3%) e VNIII (<1%) (TRILLES et al., 2008). Esse mesmo perfil epidemiológico foi encontrado por outros autores analisando amostras clínicas em algumas cidades de Minas Gerais, como Uberaba e Uberlândia (DAMASCENO-ESCOURA et al., 2018; ANDRADE-SILVA et al., 2018).

O presente estudo é o primeiro a realizar a identificação molecular de amostras clínicas da capital mineira Belo Horizonte, região metropolitana e de algumas cidades do interior de Minas Gerais. Em 2012, Pincer já havia realizado um estudo com dados de prontuários de pacientes internados em hospitais de Belo Horizonte, contudo, não havia sido feita a caracterização molecular e análise do perfil de susceptibilidade e virulência desses isolados. Em nosso trabalho, dentre os 60 isolados clínicos analisados, identificou-se que 54 (90%) pertenciam a *C. neoformans* genótipo VNI, seguido por 4 (6.7%) identificados como *C. deuterogattii* genótipo VGII e em menor proporção, 2 (3.3%) amostras pertencentes a *C. neoformans* genótipo VNII. Esses resultados estão em consonância com as publicações mundiais que demonstram que o genótipo VNI é o principal tipo molecular de *C. neoformans* que causa infecções em humanos (ANDRADE-SILVA et al., 2018; COGLIATI et al., 2013).

É importante ressaltar que existem muitos subtipos genéticos dentro de cada tipo molecular (IGREJA et al., 2004; KIDD et al., 2004; MEYER et al., 1999). Beale e colaboradores (2015) ao analisarem a diversidade genética de amostras provenientes de pacientes com meningite criptocócica na África do Sul, notaram que o conjunto de dados relacionados ao genótipo VNI apresentava subpopulações distintas que foram denominadas VNI (a), VNI (b) e VNI (c). Utilizando a técnica de MLST, Gillice e colaboradores (2011) identificaram 3 subtipos de VGII: VGIIa, VGIIb e VGIIc. Destaca-se que a identificação desses subtipos é importante pois permite analisar o perfil migratório dessas linhagens (HAGEN et al., 2013; NGAMSKULRUNGROJ et al., 2009; KIDD et al., 2005).

Além disso, ainda neste trabalho, foram identificados 4 isolados como *C. deuterogattii* VGII, entretanto, não foi possível determinar a origem de 2 amostras, uma vez que, não havia dados a respeito do local de residência dos pacientes. Mora e colaboradores (2010) encontraram frequências semelhantes em um estudo realizado com 81 amostras de origem clínica no qual foram identificados 5 isolados como genótipo VGII. É importante salientar que existe uma alta variabilidade genética entre os isolados de *C. gattii* VGII, sendo que alguns estudos já relataram a circulação dos subgenótipos VGIIa e VGIIb no nordeste do Brasil (SOUTO et al., 2016). Alguns autores sugerem que os ancestrais do genótipo VGII altamente recombinantes da floresta Amazônica conseguiram expandir suas fronteiras para a América do Norte, onde podem ter causado o surto na Ilha de Vancouver, no Canadá e no noroeste do Pacífico (HAGEN et al., 2013). Dessa forma, torna-se importante avaliar a distribuição desses isolados no Brasil a fim de prevenir possíveis surtos.

Observa-se que, conseguimos encontrar apenas 2 (3.3%) isolados *C. neoformans* VNII corroborando com os dados presentes na literatura (LEE et al., 2012; FRASES et al., 2009). Ressalta-se que a técnica a MLST permite diferenciar isolados VNB dos isolados VNII, que em muitos casos utilizando a técnica de URA5-RFLP não seria possível distingui-los (ANDRADE-SILVA et al., 2018). Desde 2009 o esquema de identificação por MLST tem sido utilizado em várias regiões do mundo a fim de analisar a estrutura populacional regional e global (MIHARA et al., 2013; DESNOS-OLLIVIER et al., 2010). Além disso, o esquema de identificação por MLST tornou-se uma importante ferramenta para diferenciar os genótipos VNI, VNII e VNB, além de suas subpopulações (ANDRADE-SILVA et al., 2018; HAGEN et al., 2015). Acrescenta-se ainda que a utilização do MLST permite uma melhor integração dos resultados em bancos de dados globais, bem como a compreensão sobre a evolução e ecologia das espécies de *Cryptococcus* (FERREIRA-PAIM et al., 2017).

No geral, poucos estudos têm relacionado os dados clínicos dos pacientes aos dados epidemiológicos. Dessa forma, há pouca informação disponível acerca da epidemiologia molecular das espécies de *Cryptococcus* (FERREIRA-PAIM et al., 2018; MEYER et al., 2003). Alguns autores relataram que existe uma relação entre o tipo molecular e o perfil de susceptibilidade antifúngica, destacando que isolados identificados como *C. gattii* VGII seriam menos susceptíveis (TRILLES et al., 2012). É notável que diferenças na epidemiologia, virulência e as diferenças regionais entre os genótipos criptocócicos provavelmente refletem diferenças fundamentais na biologia e fisiologia desses isolados, o que poderia afetar a resposta antifúngica (BEALE et al., 2012; CHONG et al., 2010).

Diante do apresentado acima, observamos em nossa pesquisa valores elevados de CIM para os antifúngicos da classe dos azólicos, especialmente para o fluconazol (2.0 a 16 µg/ml) e itraconazol (0.12 a 2.0 µg/ml). Salienta-se que apesar do nosso estudo ter encontrado apenas 4 amostras genótipo VGII, foi possível notar que os valores de CIM₅₀ para o itraconazol e voriconazol foram maiores nesses isolados se comparados aos genótipos VNI e VNII. Ainda não está completamente elucidado os mecanismos que são responsáveis pelas diferenças no perfil de susceptibilidade entre isolados de diferentes tipos moleculares (TRILLES et al., 2012). Alguns autores apontam que os elevados valores de CIM, bem como, a variabilidade nos valores de CIM para fluconazol podem ser atribuídas ao fenômeno da heterorresistência (SIONOV et al., 2010; VARMA; KWON-CHUNG, 2010). De acordo com esses trabalhos, subpopulações de células de um determinado isolado poderiam duplicar seus cromossomos contendo genes de resistência ao fluconazol. Entretanto, Lockart e colaboradores (2012) sugerem que mesmo a divisão dos isolados em tipos moleculares poderia ser insuficiente para representar as diferenças na susceptibilidade, uma vez que altos valores de CIM poderiam ter sido fixados em uma população durante a expansão clonal.

Muitos estudos que avaliaram a correlação entre a susceptibilidade *in vitro* e a resposta *in vivo* aos antifúngicos determinam que os testes de susceptibilidade representam um preditor confiável de resposta clínica e indicam que o desfecho clínico pode ser pior quando são necessárias altas concentrações de fluconazol (CIM > 8 µg/ml) (LEE et al., 2012; CHONG et al., 2010). Uma possível explicação levantada por alguns autores seria que linhagens que apresentam altos valores de CIM seriam mais virulentas do que linhagens que apresentam valores baixos de CIM para o fluconazol (LEE et al., 2012; SIONOV et al., 2009).

A maioria dos isolados do presente estudo foram obtidos de amostras provenientes do líquido (88.3%) e estão de acordo com os dados encontrados na literatura que reportam uma alta prevalência de isolamento de *Cryptococcus* a partir do líquido. Acrescenta-se que o maior

número de isolamentos realizados a partir de amostras do líquido também poderia ser justificado pelo fato desses pacientes com criptococose apresentarem meningite (FREIRE et al., 2012; BOVERS et al., 2008). Além disso, em muitos indivíduos a criptococose representa os primeiros indícios de que a infecção pelo HIV evoluiu para os sintomas da AIDS (FREIRE et al., 2012).

Como demonstrado neste trabalho, comparando-se os genótipos encontrados e o perfil de virulência *in vitro* dos isolados clínicos, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as linhagens. Esse fato pode ter relação com o pequeno número amostral dos isolados identificados como VNII (2 isolados) e VGII (4 isolados), uma vez que a menor quantidade de isolados podem não ser representativos para esses grupos. Um estudo avaliando a produção de fatores de virulência pelos diferentes genótipos constatou que não houve diferença na produção de melanina entre os genótipos quando as linhagens eram cultivadas em meio ágar níger, contudo, variações foram observadas quando se utilizava o meio L-dopa (WIESNER et al., 2012). Em nosso estudo, os ensaios de melanina foram realizados em meio ágar níger, podendo assim explicar o fato de não termos encontrado diferenças entre os variados genótipos.

Destaca-se que no presente estudo, a comparação da virulência entre os isolados de *Cryptococcus* foi realizado no modelo de infecção de larva *Tenebrio molitor*. Souza e colaboradores (2015) demonstraram que esse modelo de infecção é eficiente para se avaliar a virulência de isolados de *Cryptococcus* spp e *Candida* spp. É sabido que os insetos têm sido cada vez mais escolhidos como modelos alternativos para infecções microbianas devido a presença de um sistema imune inato similar ao dos vertebrados (TREVIANO-CONTADOR et al., 2014; BROWNE et al., 2013). Ressalta-se ainda que as larvas de *T. molitor* podem ser mantidas em temperaturas entre 25 e 37°C, o que é uma vantagem comparado aos modelos tradicionais de *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans* que não toleram variações de temperatura (DESALERMOS et al, 2012; LIONAKIS et al., 2011). Souza e colaboradores (2018) também demonstraram uma correlação entre os resultados encontrados em *Galleria mellonella* daqueles observados em *T. molitor*, sugerindo que a virulência em ambos os insetos é semelhante. É interessante salientar que 3 dos 4 isolados identificados como *C. deuterogattii* apresentaram maior virulência no modelo de infecção com *T. molitor* em comparação com a linhagem padrão ATCC 24065. Diante do exposto, nosso trabalho também reafirma a utilização de *T. molitor* como uma importante alternativa para o estudo da virulência em isolados de *Cryptococcus*.

A análise do perfil epidemiológico dos pacientes permitiu identificar que das 60 amostras obtidas, 54 eram provenientes de pacientes com algum tipo de imunossupressão, sendo que 6 (10%) pacientes apresentavam câncer, lúpus, transplante ou diabetes e 47 (78.3%) foram obtidas de pacientes HIV positivo. É sabido que a maior parte dos indivíduos infectados pelo *Cryptococcus* são pessoas com alguma imunossupressão (SLOAN et al., 2014; BRATTON et al. 2012). Ressalta-se que apesar da existência de testes diagnóstico para o HIV disponíveis gratuitamente em todo o Brasil, o diagnóstico tardio ainda é muito comum e representa um desafio para o sistema de saúde (FERREIRA-PAIM et al., 2017; MORA et al., 2012; PAPPALARDO et al., 2007).

A análise dos prontuários clínicos mostrou que a maior parte dos pacientes com criptococose eram indivíduos do sexo masculino (83.3%) com média de idade de 41.1 anos. Esses dados estão em acordo com a maioria das publicações mundiais que mostraram que os homens com idade média de 36.5 anos são os mais afetados pela criptococose (ANDRADE-SILVA et al., 2018; FERREIRA-PAIM et al., 2017; FREIRE et al., 2012). É sabido que a criptococose apresenta uma elevada taxa de mortalidade em pacientes com AIDS, com uma taxa de mortalidade de aproximadamente 35 a 40%. (VIDAL et al., 2013; MORA et al., 2012). No presente estudo, foi observada uma taxa de mortalidade de 29.8% entre os pacientes infectados pelo HIV, corroborando com os dados citados acima.

É importante destacar que a criptococose não é uma doença de notificação compulsória, dessa forma, estimativas corretas sobre a epidemiologia dessa infecção permanecem escassas (ROCHA et al., 2018; PARK et al., 2009). Em 2018 o Ministério da Saúde iniciou a estruturação de um sistema de vigilância e controle das micoses sistêmicas, incluindo a criptococose (MINISTÉRIO DA SAUDE, 2018). Esses estudos de vigilância epidemiológica se fazem necessários para a compreensão da distribuição das espécies de *Cryptococcus* na população, visando esclarecer fatores de risco e a associação com genótipos específicos. Dessa forma, o conhecimento acerca das espécies e genótipos circulantes nas cidades de Minas Gerais poderá possibilitar uma resposta adequada dos agentes de saúde, contribuindo para uma intervenção rápida e eficiente na prevenção de novos casos, bem como, no tratamento dos pacientes. Diante disso, torna-se indispensável a continuidade do nosso estudo a fim de se avaliar um maior número de isolados, analisar outros fatores de virulência como cápsula e atividade fagocítica em macrófagos, além de uma análise mais completa em relação a identificação molecular.

7 CONCLUSÃO

Com base nesse estudo foi possível concluir que o genótipo circulante em Belo Horizonte, região metropolitana e algumas cidades do interior de Minas Gerais é o genótipo VNI, correspondente ao tipo responsável pela maioria das infecções criptocócicas em humanos. Em nosso estudo também foram encontrados os genótipos VNII e VGII em menor frequência.

O ensaio de susceptibilidade antifúngica mostrou que a maioria dos isolados clínicos analisados foram sensíveis a anfotericina B, fluconazol e voriconazol, entretanto, houve resistência para o itraconazol por dois isolados de *C. deuterogattii*. Observou-se ainda que a maior parte dos isolados pertencentes ao genótipo VGII apresentaram maior virulência em modelo de infecção em *Tenebrio molitor* quando comparados as linhagens controle. Dessa forma, esses dados destacam a importância da identificação molecular das espécies de *Cryptococcus*, especialmente o genótipo VGII que é considerado altamente virulento.

Por fim, a análise dos prontuários médicos mostrou que ainda há uma elevada taxa de mortalidade ocasionado por isolados de *Cryptococcus* entre os pacientes com AIDS. Diante do exposto, conclui-se que o principal grupo de risco são indivíduos do sexo masculino com média de idade entre 20 a 50 anos e portadores de HIV. Assim, o presente estudo reforça a importância da caracterização e avaliação do perfil de susceptibilidade das espécies de *Cryptococcus*, uma vez que, conhecendo-se as espécies causadoras de infecção, bem como a dosagem antifúngica ideal, poderia contribuir para estratégias de prevenção e um melhor direcionamento clínico para o tratamento da criptococose.

REFERÊNCIAS

- ABASSI, M. et al. 2015. Cryptococcal Meningitis: Diagnosis and Management Update. **Current Tropical Medicine Reports** (2015) 2:90–99. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26279970>
- ABEGG, M. A. et al. 2006. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. **Mycopathologia**, v. 161, p. 83-91, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16463091>
- AGUIAR, P.A.D.F. et al. 2017. The epidemiology of cryptococcosis and the characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated in a Brazilian University Hospital. **Revista Instituto Medicina Tropical Sao Paulo**. 2017 Apr 13;59:e13. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28423088>
- ALIAN, S. et al. 2014. Report of Amphotericin-resistant *Cryptococcus* in undiagnosed HIV-infected patient with pulmonary and central nervous system involvement. **International Journal Medical Investigation** 2014; vol 3; num 4; 137-139. Disponível em: http://www.intjmi.com/browse.php?a_code=A-10-1-66&slc_lang=en&sid=1
- ALMEIDA, F. et al. 2015. Virulence-Associated Enzymes of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell** 14:1173–1185. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26453651>
- ALMEIDA, R. L. G.; MACHADO, E. R. 2014. *Cryptococcus* spp. in Patients with HIV/AIDS: Literature Review. **Ensaio Cienc., Cienc. Biol. Agrar. Saúde**, v. 18, n. 1, p.55-63. Disponível em: <http://pgsskroton.com.br/seer/index.php/ensaioeciencia/article/view/668>
- ALMEIDA, L.A.; ARAUJO, R. 2013. Highlights on molecular identification of closely related species. **Infection, Genetic Evolution**. 2013 Jan;13:67-75. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22982158>
- ALSPAUGH, J.A. 2015. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Fungal Genetics and Biology** 78 (2015) 55–58.doi.org/10.1016/j.fgb.2014.09.004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25256589>
- ANDRADE-SILVA, L.E. et al. 2018. Genotypic analysis of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates from Brazil reveals the presence of VNB isolates and a correlation with biological factors. **PLoS One**. 2018 Mar 5;13(3):e0193237. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29505557>
- AOKI, F.H. et al. 1999. New PCR primer pairs specific for *Cryptococcus neoformans* serotype A or B prepared on the basis of random amplified polymorphic DNA fingerprint pattern analyses. **Journal Clinical Microbiology**. 1999 Feb;37(2):315-20. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9889210>
- ARAUJO, E. C. et al. 2015. *Cryptococcus*: isolamento ambiental e caracterização bioquímica. **Arq. Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**. vol.67 no.4 Belo Horizonte July/Aug. 2015. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/127992>

ARMSTRONG-JAMES et al. 2014. A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. **Trends in Microbiology**. March 2014, Vol. 22, No. 3. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24530175>

ARVANITIS, M. et al. 2014. Molecular and nonmolecular diagnostic methods for invasive fungal infections. **Clinical Microbiology Review**. 2014 Jul;27(3):490-526. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24982319>

AZEVEDO, R.V.D.M. et al. 2016. Virulence Factors as Targets for Anticryptococcal Therapy. **J Fungi** (Basel). 2016 Nov 30;2(4). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29376946>

BABAZADEH-QAZIJAHANI, M. et al. 2014. Imidazolylchromanones containing non-benzylic oxime ethers: Synthesis and molecular modeling study of new azole antifungals selective against *Cryptococcus gattii*. **European Journal of Medicinal Chemistry** 76 (2014) 264e273. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24583607>

BADIEE, P.; HASHEMIZADEH, Z. 2014. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis and clinical management. **Indian J Med Res**. 2014 Feb;139(2):195-204. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24718393>

BEALE, M.A. et al. 2015. Genotypic Diversity Is Associated with Clinical Outcome and Phenotype in Cryptococcal Meningitis across Southern Africa. **PLoS Negl Trop Dis**. 2015 Jun 25;9(6):e0003847. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26110902>

BICANIC, T. et al. 2009. Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome in HIV-Associated Cryptococcal Meningitis: A Prospective Study. **J Acquir Immune Defic Syndr**. 2009 Jun 1;51(2):130-4. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19365271>

BOSE, I. et al. 2003. A Yeast under Cover: the Capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, Aug. 2003, p. 655–663 Vol. 2, No. 4. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12912884>

BORMAN, A.M. 2008. Molecular identification of pathogenic fungi. **J Antimicrob Chemother**. 2008 Jan;61 Suppl 1:i7-12. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18063605>

BOVERSS, M. et al. 2008. Six monophyletic lineages identified within *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by multi-locus sequence typing. **Fungal Genet Biol**. 2008 Apr;45(4):400-21. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18261945>

BOVERS et al. 2006. Unique hybrids between fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **FEMS Yeasts Res**. 2006 Jun;6(4):599-60. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16696655>

BRATTON, E.W. 2012. Comparison and temporal trends of three groups with cryptococcosis: HIV-infected, solid organ transplant, and HIV-negative/non-transplant. **PLoS One**. 2012;7(8):e43582. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22937064>

BRIZENDINE, K.D. et al. 2011. Pulmonary cryptococcosis. **Semin Respir Crit Care Med.** 2011 Dec;32(6):727-34. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22167400>

BROWN, S.M. et al. 2007. Cryptococcus neoformans, a fungus under stress. **Curr Opin Microbiol.** 2007 Aug;10(4):320-5. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17707685>

BROWNE, N. et al. 2013. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. **Virulence.** 2013 Oct 1;4(7):597-603. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23921374>

BYRNES, E.J. et al. 2011. *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. **Microbes Infect.** 2011 Oct;13(11):895-907. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21684347>

CAMPBELL, L.T et al. 2015. *Cryptococcus* strains with different pathogenic potential have diverse protein secretomes. **Eukaryotic Cell** Jun;14(6):554-63. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25841021>

CARDOSO, P.H.M. et al. 2018. Characterization of Clinical and Environmental Isolates of *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* Complex Maintained in Yeast Culture Collection in São Paulo, Brazil. **Open Journal of Epidemiology**, 8, 76-92. Disponível em: <https://doi.org/10.4236/ojepi.2018.82007>

CARMONA, E.M; LIMPER, A.H. 2017. Overview of Treatment Approaches for Fungal Infections. **Clinical Chest Med.** Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272523117300382>

CASADEVAL, A.; PERFECT, J.R. *Cryptococcus neoformans*. Washington: ASM Press. 1998.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/>. Acesso em: 10/11/2018.

CHANG, Y.C. et al. 2007. Sre1p, a regulator of oxygen sensing and sterol homeostasis, is required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol** 64: 614–629. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17462012>

CHANG, C. C. et al. 2013. Clinical and mycological predictors of cryptococcosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome. **AIDS.** 2013 Aug 24;27(13):2089-99. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23525034>

CHAYAKULKEEREE, M.; PERFECT, J.R. 2006. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North America.** 20: 507–44. Disponível em: http://www.springer.com/chapter/10.1007/978-1-59745-325-7_14

CHEN, S. C. et al. 2014. *Cryptococcus gattii* Infections. **Clinical Microbiology Reviews** p. 980–1024 Volume 27 Number 4. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25278580>

CHEN, S.C.A. et al. 1997. Phospholipase Activity in *Cryptococcus neoformans*: A New Virulence Factor?. **J Infectious Disease**. 1997 Feb;175(2):414-20. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9203663>

CHEN, L.C. et al. 1996. Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*. **Clin Diagn Lab Immunol**. 1996 Sep;3(5):570-4. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8877137>

CHIAPELLO, L.S. et al. 2008. *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan induces macrophage apoptosis mediated by nitric oxide in a caspase-independent pathway. **International Immunology**, Vol. 20, No. 12, pp. 1527–1541. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18927317>

CHONG, H.S. et al. 2010. In Vitro Susceptibility of the Yeast Pathogen *Cryptococcus* to Fluconazole and Other Azoles Varies with Molecular Genotype. **Journal of Clinical Microbiology**. 48(11):4115-20. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20844209>

CLSI. 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard-Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

COELHO, C. et al. 2014. The Intracellular Life of *Cryptococcus neoformans*. **Annu Rev Pathology**. 2014;9:219-38. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24050625>

COGLIATI, M. et al. 2016. Environmental distribution of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* around the Mediterranean basin. **FEMS Yeast Res**. 2016 Jun;16(4). pii: fow045. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27188887>

COGLIATI, M. et al. 2013. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. **Hindawi P C Scientifca**, Article ID 675213, 23 p. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24278784>

COLOMBO, E.R.C. et al. 2010. Immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS) associated with *Cryptococcus neoformans* infection in AIDS patients. **Mycoses**. 2011 Jul;54(4):e178-82. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20337940>

CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE. 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 41(5):524-544, set-out, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19009203>

CORDERO, R. J. B. et al. 2013. Antibody Binding to *Cryptococcus neoformans* Impairs Budding by Altering Capsular Mechanical Properties. **J Immunol** 2013; 190:317-323. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23233725>

COSTA, S.P.S.E, et al. 2009. First isolation of *Cryptococcus gattii* molecular type VGII and *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI from environmental sources in the city Belém, Pará, Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**. 2009 Jul;104(4):662-4. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19722095>

COX, G.M. et al.2000. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infect Immun.** 2000 Feb;68(2):443-8. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10639402>

DAMASCENO-ESCOURA, A.L. ET AL. 2018. Epidemiological, Clinical and Outcome Aspects of Patients with Cryptococcosis Caused by *Cryptococcus gattii* from a Non-endemic Area of Brazil. **Mycopathologia.** 2019 Feb;184(1):65-71. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30415450>

DANNAOUI, E. et al. 2006. Results Obtained with Various Antifungal Susceptibility Testing Methods Do Not Predict Early Clinical Outcome in Patients with Cryptococcosis. **Antimicrob Agents Chemother.** 2006 Jul;50(7):2464-70. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16801427>

DAY, J. N. et al. 2013. Combination Antifungal Therapy for Cryptococcal Meningitis. **New Engl J Med** 368(26):2522. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23802522>

DE JESUS, M. et al. 2009. Capsular localization of the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide component galactoxylomannan. **Eukaryot Cell.** 2009 Jan;8(1):96-103. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18952901>

DELATTIN, N. et al. 2014. Reactive oxygen species-inducing antifungal agents and their activity against fungal biofilms. **Future Med. Chem.** (2014) 6(1), 77–90. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24358949>

DEL-POETA, M. et al. 2012. Ten Challenges on *Cryptococcus* and Cryptococcosis. **Mycopathologia.** 2012 Jun;173(5-6):303-10. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21948062>

DESALERMOS, A. Selecting an invertebrate model host for the study of fungal pathogenesis. **PLoS Pathog.** 2012 Feb;8(2):e1002451. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22319439>

DESNOS-OLLIVIER, M. et. al. 2010. Mixed infections and In Vivo evolution in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **MBio.** 2010 May 18;1(1). pii: e00091-10. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20689742>

DOU, H. et al. 2017. Molecular characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from the environment in Beijing, China. **Med Mycol.** 2017 Oct 1;55(7):737-747. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28431114>

EISENMAN, H. C; CASADEVALL, A. 2012. Synthesis and assembly of fungal melanin. **Appl Microbiol Biotechnol** (2012) 93:931–940. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22173481>

ESCHKE, M. et al. 2015. A novel experimental model of *Cryptococcus neoformans*-related immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS) provides insights into pathogenesis. **Eur J Immunol.** 2015 Dec;45(12):3339-50. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26381487>

ESPINEL-INGROFF, A. et al. 2012. *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* Species Complex: An International Study of Wild-Type Susceptibility Endpoint Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole and Voriconazole. **Antimicrob Agents Chemother.** 2012 Nov;56(11):5898-906. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22948877>

FAN, W. et al. 2005. *Cryptococcus neoformans* gene expression during murine macrophage infection. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 8, p. 1420-33, Aug 2005. ISSN 1535-9778/1535-9786. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16087747>

FAVALESSA, O.C. et al. 2014. Molecular typing and in vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus* spp from patients in Midwest Brazil. **J Infect Dev Ctries.** 2014 Aug 13;8(8):1037-43. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25116671>

FENG, X et al. 2013. Development of a singleplex PCR assay for rapid identification and differentiation of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, *Cryptococcus gattii*, and hybrids. **J Clin Microbiol.** 2013 Jun;51(6):1920-3. doi: 10.1128/JCM.00064-13. Epub 2013 Mar 27. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23536400>

FENG, X. et al., 2008. Simultaneous identification of molecular and mating types within the *Cryptococcus* species complex by PCR-RFLP analysis. **J Med Microbiol.** 2008 Dec;57(Pt 12):1481-90. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19018017>

FERREIRA, G.F. et al. 2013. The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. **J Antimicrob Chemother.** 68(8):1801-11. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23612570>

FERREIRA, V.L.; RASO, T.F. 2012. Survey of cryptococcal antigens in urban pigeons (*Columba livia*) in São Paulo State, Brazil. **J. Poultry Sci.**, v.11, p.1-4. Disponível em: [http://www.pjbs.org/ijps/11\(1\).htm](http://www.pjbs.org/ijps/11(1).htm)

FERREIRA-PAIM, K. et al. 2017. MLST-Based Population Genetic Analysis in a Global Context Reveals Clonality amongst *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI Isolates from HIV Patients in Southeastern Brazil. **PLoS Negl Trop Dis.** 2017 Jan 18;11(1):e0005223. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28099434>

FERRER, C. et al. 2001. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. **J Clin Microbiol.** 2001 Aug;39(8):2873-9. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11474006>

FHEMIG, Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais. 2018. Disponível em: <http://www.fhemig.mg.gov.br/>. Acesso em: 11/12/2018.

FIRACATIVE, C. et al. 2012. MALDI-TOF MS enables the rapid identification of the major molecular types within the *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex. **PLoS One.** 2012;7(5):e37566. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22666368>

- FRASES, S. et al. 2009. Molecular epidemiology of isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Spain. **Rev Iberoam Micol.** 2009 Jun 30;26(2):112-7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19631160>
- FREIRE, A.K. et al. 2012. Molecular characterisation of the causative agents of Cryptococcosis in patients of a tertiary healthcare facility in the state of Amazonas-Brazil. **Mycoses.** 2012 May;55(3):e145-50. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22360142>
- GAZZONI, A. F. et al. 2009. Histopathology, serology and cultures in the diagnosis of cryptococcosis. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo** vol.51 no.5 São Paulo Sept./Oct. 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19893977>
- GIACOMAZI, J. et al. 2015. The burden of serious human fungal infections in Brazil. *Mycoses: Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases.* **Mycoses.** 59(3):145-50. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26691607>
- GILLECE, J.D. et al. 2011. Whole genome sequence analysis of *Cryptococcus gattii* from the Pacific Northwest reveals unexpected diversity. **PLoS One.** 2011;6(12):e28550. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22163313>
- GOULART, L. et al. 2010. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* genes preferentially expressed during rat macrophage infection. **Medical Mycology** November 2010, 48, 932–941. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20302549>
- GRACIELE-MELO et al. 2016. Use of Polymerase chain Reaction for *Cryptococcus neoformans* Genome Detection in Cerebrospinal Fluid for Neurocryptococcosis Diagnosis. **Med mycol Open Access** 2016, 2:13. Disponível em: <http://mycology.imedpub.com/>
- GROSSMAN, N.T.; CASADEVALL, A. 2017. Physiological Differences in *Cryptococcus neoformans* Strains *In Vitro* versus *In Vivo* and Their Effects on Antifungal Susceptibility. **Antimicrob Agents Chemother.** 2017 Feb 23;61(3). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28031206>
- GROVER, N. et al. 2007. Ecological niche of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* in decaying wood of trunk hollows of living trees in Jabalpur City of Central India. **Mycopathologia.** 2007 Oct;164(4):159-70. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17661160>
- GULLO, F. P. et al. 2013. Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** (2013) 32:1377–1391. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24141976>
- GYAWALI, R. et al. 2017. A family of secretory proteins is associated with different morphotypes in *Cryptococcus neoformans*. **Appl Environ Microbiol.** 2017 Feb 15;83(5). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28039134>
- HAGEN, F. et al. 2015. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genetics and Biology** 78 (2015) 16–48. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25721988>

HANSEN, J. et al. 2013. Large-scale evaluation of the immuno-mycologies lateral flow and enzyme-linked immunoassays for detection of cryptococcal antigen in serum and cerebrospinal fluid. **Clin Vaccine Immunol.** 2013 Jan;20(1):52-5. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23114703>

HUSTON, S.M.; MODY, C.H. 2009. Cryptococcosis: an emerging respiratory mycosis. **Clin Chest Med.** 2009 Jun;30(2):253-64. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19375632>

IDNURN, A.; LIN, X. 2015. Rising to the challenge of multiple *Cryptococcus* species and the diseases they cause. **Fungal Genet Biol.** 2015 May;78:1-6. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25983191>

IGREJA, R.P. et al. 2004. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro. **Med Mycol.** 2004 Jun;42(3):229-38. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15283237>

ILLNAIT-ZARAGOZI, M.T. et al. 2010. Microsatellite typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* isolates from Cuba shows multiple genetic lineages. **PLoS One.** 2010 Feb 9;5(2):e9124. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20161737>

IQBAL,N. et al. 2010. Correlation of genotype and in vitro susceptibilities of *Cryptococcus gattii* strains from the Pacific Northwest of the United States. **J Clin Microbiology.** 2010 Feb;48(2):539-44. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20007380>

JESÚS-BERRÍOS, J. et al. 2003. Enzymes that Counteract Nitrosative Stress Promote Fungal Virulence. **Current Biology,** Vol. 13, 1963–1968. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14614821>

KIDD,S.E. et al 2004. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2004 Dec 7;101(49):17258-63. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15572442>

KRONSTAD, J. W. et al.2011. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nat Rev Microbiol,** v. 9, n. 3, p. 193-203, Mar 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21326274>

KWON-CHUNG, K.J. et al. 2017. The Case for Adopting the “Species Complex” Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **mSphere.** 2017 Jan 11;2(1). pii: e00357-16. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28101535>

KWON-CHUNG, K. J. et al. 2014. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **Cold Spring Harb Perspect Med** 2014,July; 4(7):a019760. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24985132>

KWON-CHUNG, K. J. et al. 2011. Systematics of the Genus *Cryptococcus* and Its Type Species *C. neoformans*. In: Heitman, J., Kozel,T.R., Kwon-Chung, K.J., Perfect, J.R., Casadevall, A. (Eds.), *Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast.* ASM

- Press, pp.3–16. Disponível em: <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555816858.ch01>
- KWON-CHUNG, K.J; BENNET, J.E. 1992. **Medical Micology**. Philadelphia: Lea and Febiger. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46651992000600018>
- KWON-CHUNG, K. J., et al.1982. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). **J Clin Microbiology**. 1982 Mar;15(3):535-7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7042750>
- LATOUCHE, G.N et al. 2003. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the phospholipase B (PLB1) gene for subtyping of *Cryptococcus neoformans* isolates. **Appl Environ Microbiol**. 2003 Apr;69(4):2080-6. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12676686>
- LEAL, A. L. et al. 2008. *Cryptococcus* species identification by multiplex PCR. **Med Mycology**. 2008 Jun;46(4):377-83. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18415847>
- LEE, G.A. et al. 2019. Molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Western Australia and correlation with antifungal susceptibility. **Med Mycol**. 2019 Jan 15. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30649538>
- LI, S.S.; MODY, C.H. 2010. *Cryptococcus*. **Proceedings of the American Thoracic Society**, Vol. 7, No. 3 pp. 186-196. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20463247>
- LIONAKIS, M.S. 2011. *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts: new tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology. **Virulence**. 2011 Nov-Dec;2(6):521-7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22186764>
- LITVINTSEVA, AP. et al. 2006. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana. **Genetics**. 2006 Apr;172(4):2223-38. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16322524>
- LOCKHART, S.R. et al. 2016. Whole-genome analysis of *Cryptococcus gattii*, southeastern United States. **Emerg Infectious Disease**. 2016 Jun;22(6):1098-101. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27191335>
- LOYSE, A. et al. 2013. Combination antifungal therapy for cryptococcal meningitis. **N Engl J Med**. 2013 Jun 27;368(26):2522. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23802522>
- MAC-CANNELL, D. 2013. Bacterial strain typing. **Clin Lab Med**. 2013 Sep;33(3):629-50. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23931842>
- MAKADZANGE, A.T. et al. 2010. Early versus Delayed Initiation of Antiretroviral Therapy for Concurrent HIV Infection and Cryptococcal Meningitis in Sub-Saharan Africa. **Clinical**

Infectious Diseases 50(11) (2010) 1532–1538. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20415574>

MARTINS, L.M. et al. 2011. Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piauí (northeastern Brazil). **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**. 2011 Sep;106(6):725-30. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22012227>

MATOS, C.S. et al. 2012. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus* spp. in Bahia, Brazil: molecular types and antifungal susceptibilities. **Eur J Clin Microbiol Infectious Disease** (2012) 31:1647–1652. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22278291>

MAY, R.C. et al., 2015. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nat Review Microbiol**. 2016 Feb;14(2):106-17. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26685750>

MAZIARS, E.K.; PERFECT, J.R. 2016. Cryptococcosis. **Infect Disease Clin North Am**. 2016 Mar;30(1):179-206. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26897067>

MCMULLAN, B. J. et al. 2013. *Cryptococcus gattii* infections: contemporary aspects of epidemiology, clinical manifestations and management of infection. **Future Microbiol**. 8:1613–1631. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24266360>

MERRY, M.; BOULWARE, D. R. 2016. Cryptococcal Meningitis Treatment Strategies: A Cost-Effectiveness Analysis in the United States affected by the Explosive Cost of Flucytosine. **Clin Infectious Disease**. 2016 Jun 15;62(12):1564-8. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27009249>

MESA-ARANGO, P. et al. 2014. The Production of Reactive Oxygen Species Is a Universal Action Mechanism of Amphotericin B against Pathogenic Yeasts and Contributes to the Fungicidal Effect of This Drug. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** p. 6627–6638, v.58, n.11. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25155595>

MEYER, W. et al. 2011. Molecular typing of the *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex. **ASM Science**.

MEYER, W. et al. 2009. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Med Mycology**. 2009;47(6):561-70. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19462334>

MEYER, W. et al. 2003. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerg Infectious Disease**. 2003 Feb;9(2):189-95. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12603989>

MEYER, W. et al. 1993. DNA- and PCR-fingerprinting in fungi. **EXS**. 1993;67:311-20. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8400701>

MEYER, W. et al. 1993. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus*

neoformans. **J Clin Microbiol.** 1993 Sep;31(9):2274-80. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8408543>

MIHARA, T. et al. 2009. Multilocus sequence typing of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV associated cryptococcosis in Nagasaki, Japan. **Med Mycology.** 2013 Apr;51(3):252-60. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22901045>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2018. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/> Acesso em: 12/01/2019.

MONTAGNA, M.T. et al. 2018. Molecular characterization of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from environmental sources and genetic comparison with clinical isolates in Apulia, Italy. **Environ Res.** 2018 Jan;160:347-352. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29054089>

MORA, D.J. 2012. Clinical, epidemiological and outcome features of patients with cryptococcosis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Mycopathologia.** 2012 Jun;173(5-6):321-7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22130645>

MORA, D.J. et al. 2010. Genotype and mating type distribution within clinical *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from patients with cryptococcal meningitis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Med Mycology.** 2010 Jun;48(4):561-9. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19905964>

MORETTI, M. L. et al. Consenso em criptococose: 2008. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.41, n.5, p.524-544, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822008000500022>

NARASIPURA, S. D. et al. 2005. Characterization of *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* SOD2 reveals distinct roles of the two superoxide dismutases in fungal biology and virulence. **Molecular Microbiology** (2005) 55 (6), 1782–1800. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15752200>

NEGRONI, R. M..D. 2012. Cryptococcosis. **Clinics in Dermatology.** 30, 599–609. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23068147>

NGAMSKULRUNGROJ, P. et al. 2009. Genetic diversity of the *Cryptococcus* species complex suggests that *Cryptococcus gattii* deserves to have varieties. **PLoS One.** 2009 Jun 10;4(6):e5862. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19517012>

NICOLA, A. M.; CASADEVALL, A. 2012. In vitro measurement of phagocytosis and killing of *Cryptococcus neoformans* by macrophages. **Methods Mol Biol**, v. 844, p. 189-97, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22262444>

NIMRICHTER, L. et al. 2007. Self-aggregation of *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan is dependent on divalent cations. **Eukaryot Cell** 6: 1400–1410. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17573547>

NUCCI, M. 2010. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clin Infect Dis.** 2010 Sep 1;51(5):561-70. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20658942>

- NYAZIKA, T.K. et al. 2016. *Cryptococcus tetragattii* as a major cause of cryptococcal meningitis among HIV-infected individuals in Harare, Zimbabwe. **J Infect.** 2016 Jun;72(6):745-752. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27038502>
- OGUNDEJI, A.O. et al. 2016. Method for identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* useful in resource-limited settings. **J Clinical Pathology.** 2016 Apr;69(4):352-7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26598625>
- OKAGAKI, L.H.; NIELSEN, K. 2012. Titan cells confer protection from phagocytosis in *Cryptococcus neoformans* infections. **Eukaryot Cell.** 2012 Jun;11(6):820-6. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22544904>
- PAPPALARDO, M.C. et al. 2007. AIDS-associated central nervous system cryptococcosis: a Brazilian case study. **AIDS.** 2007 Sep 12;21(14):1971-2. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17721106>
- PAPPALARDO, M.C.S.M.; MELHEM, M.S.C. 2003. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 45(6): 299-305, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14762626>
- PARK, B. J. et al. 2009. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS.** 2009 Feb 20;23(4):525-30. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19182676>
- PERFECT, J.R.; BICANIC, T. 2015. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. **Fungal Genet Biol.** 2015 May;78:49-54. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25312862>
- PERFECT, J. R. et al. 2010. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the **Infectious Diseases Society of America.** **Clin. Infect. Dis.** 50:291–322. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20047480>
- PFALLER, M. A. 2012. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. **The American Journal of Medicine,** Vol 125, No 1A, January 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22196207>
- PINCER, V.M. 2012. Estudo dos casos de pacientes com neurocriptococose atendidos no hospital Eduardo de Menezes no período de 2007 a 2012. Dissertação- Santa Casa Belo Horizonte, p.43-54, 2012.
- PINI, G. et al. 2017. Enzymatic characterization of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* strains isolated in Italy. **Revista Iberoamericana Micologia.** Volume 34, Issue 2, April–June 2017, Pages 77-82. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1130140616300377>
- PREFEITURA DE BELO HORIZONTE. 2018. Disponível em: <https://prefeitura.pbh.gov.br/>. Acesso em: 11/12/2018.

RAMOS, J.R. et al. 2008. Optimizing reproducibility evaluation for random amplified polymorphic DNA markers. **Genet Mol Res.** 2008;7(4):1384-91. Disponível: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19065774>

RAJASINGHAM, R. et al. 2017. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **Lancet Infectious Disease.** 2017 Aug;17(8):873-881. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28483415>

REFOJO, N. et al. 2009. Isolation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from trunk hollows of living trees in Buenos Aires City, Argentina. **Medical Mycology.** Volume 47, Issue 2, 1 March 2009, Pages 177–184. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18654914>

RHEIN, J. et al. 2015. Diagnostic performance of a multiplex PCR assay for meningitis in an HIV-infected population in Uganda. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 2016 Mar;84(3):268-73. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26711635>

RHODES, J. et al. 2017. Tracing Genetic Exchange and Biogeography of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* at the Global Population Level. **Genetics.** 2017 Sep;207(1):327-346. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28679543>

ROBERTSON, E. J. et al. 2014. *Cryptococcus neoformans* Ex Vivo Capsule Size Is Associated With Intracranial Pressure and Host Immune Response in HIV-associated Cryptococcal Meningitis. **The Journal of Infectious Diseases** 2014;209:74–82. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23945372>

ROCHA, D.F.S. 2018. MLST reveals a clonal population structure for *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI isolates from clinical sources in Amazonas, Northern-Brazil. **PLoS One.** 2018 Jun 8;13(6):e0197841. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29883489>

ROEMER, T.; KRYSAN, D. J. 2014. Antifungal Drug Development: Challenges, Unmet Clinical Needs, and New Approaches. **Cold Spring Harb Perspect Med** 2014;4:a019703. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24789878>

ROSSI, S.A. et al., 2016. Impact of Resistance to Fluconazole on Virulence and Morphological Aspects of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Isolates. **Front Microbiology.** 2016 Feb 16;7:153. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26909069>

SANTA CASA.2018. Disponível em: <http://www.santacasabh.org.br/>. Acesso em: 11/12/2018.

SANTIAGO-TIRADO, FH, et al. 2017. Trojan horse transit contributes to blood-brain barrier crossing of a eukaryotic pathogen. **mBio** 8: e02183-16. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28143979>

SCORZONI, L. et al. 2013. Antifungal Efficacy during *Candida krusei* Infection in Non-Conventional Models Correlates with the Yeast In Vitro Susceptibility Profile. **PLoS One.** 2013;8(3):e60047. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23555877>

SKOLNIK, K. et al. 2017. Cryptococcal lung infections. **Clin Chest Med.** 2017 Sep;38(3):451-464. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28797488>

SHIRLEY, R. M.; BADDLEY, J. W. 2009. Cryptococcal lung disease. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 15, p. 254-260, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19352182>

SIDRIM, J.J.C. et al. 2010. Molecular methods for the diagnosis and characterization of *Cryptococcus*: a review. **Can J Microbiol.** 2010 Jun;56(6):445-58. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20657615>

SIFUENTES-OSORNIO, J. et al. 2012. Epidemiology of Invasive Fungal Infections in Latin America. **Curr Fungal Infect Rep.** 2012 Mar;6(1):23-34. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22363832>

SIONOV, E. et al. 2010. *Cryptococcus neoformans* overcomes stress of azole drugs by formation of disomy in specific multiple chromosomes. **PLoS Pathog.** 2010 Apr 1;6(4):e1000848. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20368972>

SLOAN, D. et al. 2008. Treatment of acute cryptococcal meningitis in HIV infected adults, with an emphasis on resource-limited settings. **Cochrane Database Syst Rev** (4):CD005647. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18843697>

SLOAN, D.J; PARRIS, V. 2014. Cryptococcal meningitis: epidemiology and therapeutic options. **Clinical Epidemiology.** 2014; 6: 169–182. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4026566/>

SORRELL, T.C., et al. 2016. Cryptococcal transmigration across a model brain blood-barrier: evidence of the Trojan horse mechanism and differences between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* strain H99 and *Cryptococcus gattii* strain R265. **Microbes Infect.** 2016 Jan;18(1):57-67. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26369713>

SOUTO, A.C. et al. 2016. Population Genetic Analysis Reveals a High Genetic Diversity in the Brazilian *Cryptococcus gattii* VGII Population and Shifts the Global Origin from the Amazon Rainforest to the Semi-arid Desert in the Northeast of Brazil. **PLoS Negl Tropical Disease.** 2016 Aug 16;10(8):e0004885. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27529479>

SOUZA, P.C. et al. 2018. An Invertebrate Host to Study Fungal Infections, Mycotoxins and Antifungal Drugs: *Tenebrio molitor*. **J Fungi** (Basel). 2018 Nov 12;4(4). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30424549>

SOUZA, P.C. et al. 2015. *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. **J Microbiol Methods.** 2015 Nov;118:182-6. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26453946>

SOUZA, L.K. et al. 2010. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* species complex isolates in Goiania, Brazil. **Mycoses.** 2010 Jan;53(1):62-7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19500261>

SPRINGER, D.J.; CHATURVEDI, V. 2010. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. **Emerg Infect Dis.** 2010 Jan;16(1):14-20. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20031037>

SUGIURA, Y. et al. 2017. Difficulty in diagnosing chronic meningitis caused by capsule-deficient *Cryptococcus neoformans*. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.** 2005 Oct;76(10):1460-1. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16170098>

TREVIJANO-CONTADOR, N. et al. 2015. *Cryptococcus neoformans* induces antimicrobial responses and behaves as a facultative intracellular pathogen in the non mammalian model *Galleria mellonella*. **Virulence.** 2015;6(1):66-74. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25531532>

TRILLES, L. et al. 2008. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz,** Rio de Janeiro, Vol. 103(5): 455-462. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18797758>

TRILLES, L. et al. 2012. Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex. **Medical Mycology.** 2012 Apr;50(3):328-32. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21859388>

UNAIDS. 2017. Disponível em: < <http://www.unaids.org/>>. Acesso em: 10/11/2018.

VARMA, A.; KWON-CHUNG. K.J. 2010. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to fluconazole. **Antimicrob Agents Chemother.** 2010 Jun;54(6):2303-11. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20385871>

VERMES, A. 2000. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. **J Antimicrob Chemother.** 2000 Aug;46(2):171-9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10933638>

VIDAL, J.E. et al. 2013. Strategies to reduce mortality and morbidity due to AIDS-related cryptococcal meningitis in Latin America. **Braz J Infectious Disease.** 2013 May-Jun;17(3):353-62. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23665012>

VOELZ, K.; MAY, R.C. 2010. Cryptococcal Interactions with the Host Immune System. **Eukaryot Cell** 2010; 9: 835-46. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20382758>

WIESNER, D.L. et al. 2012. Cryptococcal genotype influences immunologic response and human clinical outcome after meningitis. **MBio.** 2012 Sep 25;3(5). pii: e00196-12. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23015735>

WILLIAMSON, P.R. et al. 2016. Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. **Nat Rev Neurol.** 2017 Jan;13(1):13-24. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27886201>

WHITNEY, L.C.; BICANIC, T. 2015. Treatment principles for *Candida* and *Cryptococcus*. **Cold Spring Harb Perspect Med.** Nov 10;5(6). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25384767>

WIRTH, F. et al. 2018. Molecular types of *Cryptococcus* species isolated from patients with cryptococcal meningitis in a Brazilian tertiary care hospital. **Braz J Infectious Disease**. 2018 Nov - Dec;22(6):495-498. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30508502>

XU, J. 2006. Fundamentals of fungal molecular population genetic analyses. **Curr Issues Molecular Biology**. 2006 Jul;8(2):75-89. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16875415>

ZARAGOZA, O.; NIELSEN, K. 2013. Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: cells with a giant impact. **Curr Opin Microbiology**. 2013 Aug;16(4):409-13. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23588027>

ZARAGOZA, O et al. 2010. Fungal cell gigantism during mammalian infection. **PLoS Pathog**. 2010 Jun 17;6(6):e1000945. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20585557>

ZARAGOZA, O. et al. 2009. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Adv. Appl. Microbiol.** 68: 133–216. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19426855>

ANEXO 1 – TERMO DE APROVAÇÃO



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Projeto: CAAE – 80166617.2.0000.5149

**Interessado(a): Profa. Susana Johann
Depto. Microbiologia
Instituto de Ciências Biológicas- UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 14 de março de 2018, o projeto de pesquisa intitulado “ **Leveduras causadoras de micoses sistêmicas oportunistas em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: identificação em nível de espécie e perfil de susceptibilidade a antifúngicos comerciais**” bem como:

- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
- Termo de Assentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Vivian Resende', is positioned above the printed name.

**Prof. Dra. Vivian Resende
Coordenadora do COEP-UFMG**

ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **“Leveduras causadoras de micoses sistêmicas oportunistas em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: identificação em nível de espécie e perfil de susceptibilidade a antifúngicos comerciais”** de responsabilidade da pesquisadora Susana Johann. Esta pesquisa tem como objetivo saber quais são as leveduras que estão causando doenças e verificar quais são os melhores medicamentos para o tratamento destas doenças por leveduras. Para esta pesquisa você não passará por nenhum procedimento e sua contribuição será na autorização de que a levedura isolada, do seu material biológico que foi coletado no procedimento de diagnóstico solicitado pelos médicos que atendem você, seja estudada na presente pesquisa. Além disto, nesta pesquisa usaremos os dados contidos no prontuário médico. Pedimos, desta forma, a sua autorização para o armazenamento (pelo período de 4 anos) (Alternativamente: pelo período máximo de 10 (dez) anos) e a utilização para a pesquisa da levedura isolada do seu material biológico. Após o fim desta pesquisa a levedura será destruída (Alternativamente: Depois de transcorrido o período de 10 (dez) anos, a levedura será destruída).

O cadastro da (s) levedura (s) isolada (s) de seu material biológico será realizado por meio de um banco de dados, onde apenas a equipe de pesquisadores, envolvida no projeto, tem acesso. As leveduras isoladas serão mantidas em cultivo e/ou armazenadas em freezer -80 graus (por um período máximo de 10 (dez) anos) e analisadas no (Laboratório Taxonomia, biodiversidade e biotecnologia de Fungo, Departamento de Microbiologia, ICB-UFMG) devidamente identificadas com os respectivos códigos. Caso algum pesquisador queira utilizá-la futuramente, o mesmo deverá submeter um novo projeto e, somente depois da aprovação do mesmo no Comitê de Ética, terá acesso ao banco de dados. Reforçamos que todos os dados gerados nessa pesquisa serão mantidos em sigilo. Além disso, sempre que solicitado, as informações (resultados) serão fornecidas ao Sr. (a).

Este estudo apresenta riscos mínimos de identificação sonora do participante, o que poderia gerar constrangimento. Para minimizar este risco a pesquisadora, bem como toda a equipe, irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, privacidade e proteção de imagem. Você não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Todo o projeto será desenvolvido segundo as normas e leis que regem o uso de material humano em pesquisa. Assim, ao fazermos a identificação de quais são as leveduras que estão causando

doenças poderemos verificar quais são os medicamentos mais eficazes para cada tipo de levedura encontrada e assim esta pesquisa poderá servir para a busca do tratamento mais específico para as doenças causadas por leveduras.

Para participar deste estudo o Sr. (a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, o Sr.(a) tem assegurado o direito à indenização. O Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar e a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, poderá retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A sua participação é voluntária, e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que o Sr. (a) é atendido (a) pelo pesquisador, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados obtidos pela pesquisa, a partir de seu material biológico, estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O (A) Sr. (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar.

Rubrica do pesquisador: _____ *Rubrica do participante:* _____

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no “Laboratório Taxonomia, biodiversidade e biotecnologia de Fungos -ICB-UFGM,”, e a outra será fornecida ao Sr. (a). Os dados, materiais e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 4 (quatro) anos na sala Laboratório Taxonomia, biodiversidade e biotecnologia de Fungos -ICB-UFGM e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____ fui informado (a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa “Leveduras causadoras de micoses sistêmicas oportunistas em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: identificação em nível de espécie e perfil de susceptibilidade a antifúngicos comerciais”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a

qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

() Concordo que o meu material biológico seja utilizado somente para esta pesquisa.

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

ANEXO 3 - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TALE)

O menor, sob sua responsabilidade, está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa “Leveduras causadoras de micoses sistêmicas oportunistas em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: identificação em nível de espécie e perfil de susceptibilidade a antifúngicos comerciais” de responsabilidade da pesquisadora Susana Johann. Esta pesquisa tem como objetivo saber quais são as leveduras que estão causando doenças e verificar quais são os melhores medicamentos para o tratamento destas doenças por leveduras. Para esta pesquisa o menor não passará por nenhum procedimento e sua contribuição será na autorização de que a levedura isolada, do seu material biológico que foi coletado no procedimento de diagnóstico solicitado pelos médicos que atendem o menor, seja estudada na presente pesquisa. Além disto, nesta pesquisa usaremos os dados contidos no prontuário médico. Pedimos, desta forma, a sua autorização para o armazenamento (pelo período de 4 anos) e a utilização para a pesquisa da levedura isolada do material biológico do menor sob sua responsabilidade. Após o fim desta pesquisa a levedura será destruída. Este estudo apresenta riscos mínimos de identificação sonora do participante, o que poderia gerar constrangimento, para minimizar este risco a pesquisadora, bem como toda a equipe, irá tratar a sua identidade e a do menor com padrões profissionais de sigilo, privacidade e proteção de imagem. Você e menor não serão identificados em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Todo o projeto será desenvolvido segundo as normas e leis que regem o uso de material humano em pesquisa. Assim, ao fazermos a identificação de quais são as leveduras que estão causando doenças poderemos verificar quais são os medicamentos mais eficazes para cada tipo de levedura encontrada e assim esta pesquisa poderá servir para a busca do tratamento mais específico para as doenças causadas por leveduras.

Para participar deste estudo o Sr. (a) ou o menor não terão nenhum custo, nem receberão qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, o Sr.(a) e o menor tem assegurado o direito à indenização. O Sr. (a) e o menor terão o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejarem e estarão livres para participar ou recusar-se a participar e a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A sua participação é voluntária, e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que o Sr. (a) e o menor são atendido (a) pelo pesquisador, que tratará

a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados obtidos pela pesquisa, a partir de seu material biológico, estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome e do menor ou o material que indique a participação não será liberado sem a sua permissão.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no "Laboratório Taxonomia, biodiversidade e biotecnologia de Fungos -ICB-UFMG," e a outra será fornecida ao Sr. (a). Os dados, materiais e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 4 (quatro) anos na sala Laboratório Taxonomia, biodiversidade e biotecnologia de Fungos -ICB-UFMG e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade e a do menor com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____ e responsável pelo (a) menor _____ fui informado (a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa "Leveduras causadoras de micoses sistêmicas oportunistas em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: identificação em nível de espécie e perfil de susceptibilidade a antifúngicos comerciais", de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

() Concordo que o meu material biológico do menor sob minha responsabilidade seja utilizado somente para esta pesquisa.

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

