Faculdade de Saúde Pública
Universidade de São Paulo

Fatores Microbiológicos da Criptococose e sua Importância na
Carga da Doença em Pacientes Atendidos em um Hospital de
Referência do Estado de São Paulo

Lidiane de Oliveira

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Saúde Pública da Faculdade de
Saúde Pública da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. Fredi Alexander Diaz-Quijano
Coorientadora: Profa. Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem

São Paulo
2019

Fatores microbiológicos da criptococose e sua importância na carga da doença em pacientes atendidos em um hospital de referência do Estado de São Paulo

Lidiane de Oliveira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. Fredi Alexander Diaz-Quijano
Coorientadora: Profa. Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem

São Paulo
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Ficha elaborada pelo Sistema de Geração Automática a partir de dados fornecidos pelo(a) autor(a)
Bibliotecária da FSP/USP: Maria do Carmo Alvarez - CRB-8/4359

Oliveira, Lidiane de

Fatores Microbiológicos da Criptococose e sua Importância na Carga da Doença em Pacientes Atendidos em um Hospital de Referência do Estado de São Paulo : antifúngicos; prognóstico, Saúde Pública / Lidiane de Oliveira; orientador Fredi Alexander Diaz-Quijano; coorientadora Marcia de Souza Carvalho Melhem. -- São Paulo, 2019.
117 p.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2019.

1. Criptococose. 2. Cryptococcus neoformans. 3. Cryptococcus gattii. 4. antifúngicos. 5. prognóstico. I. Diaz-Quijano, Fredi Alexander, orient. II. Melhem, Marcia de Souza Carvalho, coorient. III. Título.

DEDICATÓRIA

À minha família
Meu alicerce
Por todo amor e apoio

AGRADECIMENTOS

À Deus, por fazer de cada dia uma nova oportunidade e por me conduzir em mais este desafio. Por me ouvir em todas as orações, por me dar perseverança e paciência, e iluminar meus caminhos.

À minha família, pela presença, pela ajuda, por compreender meus momentos de ausência e me acompanhar nesta trajetória. Ao meu pai Luís Serafim de Oliveira, por ser exemplo de trabalho, coragem e determinação e à minha mãe Maria das Dôres de Oliveira, minha amiga, companheira e grande motivadora, obrigada pela compreensão, seu amor e dedicação. Aos meus irmãos e amigos, Lenildo e Luciana de Oliveira, pelo companheirismo, pela amizade e pelos momentos de descontração. Pela minha prima Jaqueline, por sua presença em nossas vidas e por sua sensibilidade e carinho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fredi Alexander Diaz-Quijano, pelo aprendizado, atenção e paciência. Agradeço imensamente por aceitar este desafio e pela confiança.

À minha coorientadora Prof. Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem por sua dedicação e paciência. Agradeço por todos estes anos de aprendizado, pela confiança, carinho e por sua amizade. Serei eternamente grata por tudo o que fez por mim.

Aos professores membros da banca e pré-banca, por suas valiosas contribuições para este trabalho.

À pesquisadora Dra. Maria Walderez Szeszs, por acreditar em mim e me incentivar a iniciar a pós-graduação. Agradeço pela sua amizade e pelos valiosos conselhos.

Ao meu amigo Dr. Lucas Xavier Bonfietti, que tanto me ajudou e apoiou. Agradeço pela sua presença em tantos momentos. Por ser sempre tão otimista, por me incentivar e me alegrar tantas vezes. Foi um privilégio conviver com você todos estes anos. Obrigada por tudo!

Às pesquisadoras do Núcleo de Micologia Sandra Regina Brasil S. Pukinskas e Marilena dos Anjos Martins, pela colaboração neste trabalho, pelos momentos de reflexão, e por estarem sempre dispostas a ajudar.

À pesquisadora Dra. Dulcilena de Matos Castro e Silva, por sua preciosa amizade. Agradeço por toda ajuda nestes anos, por sua dedicação e disposição.

Às amigas que a micologia me deu, Aline, Daíse, Dayane e Juliana. Agradeço pela amizade construída ao longo destes anos. Agradeço também por compartilhar com vocês tantos momentos de anseios, alegrias e aprendizado.

Aos alunos de pós-graduação, Carlos, Dality, Débora e Milena, pela ajuda no laboratório, pela convivência e pelo incentivo, muito obrigada.

Aos funcionários Andrés, Jeferson, Kenia, Lindete, Miriam e Rosangela, do Núcleo de Micologia do IAL, pela amizade e apoio em todos estes anos. Obrigada pela ajuda na parte laboratorial, e pela oportunidade de conviver e de aprender com vocês.

À Dra. Paula Ordonhez Rigato do Centro de Imunologia do IAL, pela ajuda com os experimentos de citometria de fluxo. Agradeço pela colaboração, paciência e aprendizado.

Aos professores Dra. Renata C. Pascon e Dr. Marcelo A. Vallim do laboratório de Interações Microbianas da UNIFESP, campus Diadema. Por me receberem no laboratório, pela valiosa colaboração no planejamento e realização dos experimentos de PCR em tempo Real e pelo aprendizado. Agradeço também aos alunos Amanda, Alexandre, Gabrielle, Kevin e Stefania, pelo convívio, auxílio no laboratório e momentos de descontração durante minha estadia. De modo especial ao meu amigo Thiago, que além de tudo é meu exemplo de dedicação e compromisso. Agradeço pela sua amizade em todos estes anos.

Aos médicos Renata Buccheri, Oscar Chagas e Dr. José E. Vidal por toda a ajuda durante o planejamento do trabalho e na coleta de dados dos pacientes no IIER.

Ao Dr. Oscar Zaragoza Hernandez, do Instituto de Salud Carlos III em Majadahonda, Espanha. Por me receber no laboratório, pela paciência, aprendizado e por toda dedicação a este trabalho. Agradeço também aos alunos e funcionários que tive o prazer de conviver durante os 6 meses de estadia. Emília, Maria José, Alicia, Ana Alastruey, Suélen, Elisabete, Núria, Clara, Olga, Cristina, Rocio, Daniel, Álvaro, Bea, Charo, Ana, Pilar, Maria Candida, Teresa, Gabriela, Anna Vick. Muito obrigada.

Às minhas amigas da biologia e comadres Denise, Erika, Michele e Thiliê, que me acompanham desde o início dessa trajetória. Muito obrigada pela amizade e pela torcida todos estes anos. Agradeço por poder compartilhar este momento com vocês.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Saúde Pública da USP. Agradeço pela disposição, pelo apoio e aprendizado.

Ao CNPq pela concessão da bolsa e à CAPES pelo apoio financeiro.

Ainda que eu tivesse o dom da profecia,
o conhecimento de todos os mistérios e de toda a ciência;
ainda que eu tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas,
se não tivesse o amor, eu nada seria.

RESUMO

Introdução: A meningite criptocócica causa elevada mortalidade, sobretudo em pacientes acometidos de alguma condição imunossupressora. O objetivo deste estudo foi identificar fenômenos de baixa suscetibilidade a antifúngicos e outros preditores clínicos que possam explicar falha terapêutica e recidiva da neurocriptococose

Metodologia: Foram avaliados 96 casos com coleta de dados clínicos epidemiológicos e laboratoriais. Os isolados foram identificados quanto a genótipo molecular, suscetibilidade de anfotericina B (AMB) e fluconazol (FCZ) pela determinação da concentração inibitória mínima (Minimal Inhibitory Concentration, MIC), nível de heteroresistência ao FCZ (NHF) e determinação do tempo de morte frente AMB (Time-Kill, TK). Foram selecionados isolados heteroresistentes para análise quantitativa de DNA por PCR em tempo Real, expressão de bombas de efluxo por citometria de fluxo e isolados tolerantes a AMB para estudo de resistência ao estresse oxidativo. Foi realizada análise univariável e múltipla usando regressão logística para identificar preditores de óbito hospitalar e de um desfecho composto definido pelo óbito, encaminhamento para unidade de terapia intensiva ou recidiva 6 meses após alta hospitalar.

Resultados: A maioria dos pacientes eram imunodeprimidos, com CD4 de 2 a 722 cel./mm³ e 96,7% eram portadores do HIV. Foram identificados 93 isolados de *C. neoformans*, sendo 76 do genótipo VNI e 17 VNII e 3 *C. gattii*, todos VGII. MIC de AMB variou de 0,012 a 0,94 mg/L e MIC de FCZ estiveram entre 0,12 e 64 mg/L. Resistência a FCZ (MIC>16mg/L) foi maior em VNI do que em VNII (p=0,03). Dentre os isolados VNI, 64,5% sofreu atividade fungicida até as 24h (TK24) de exposição à AMB e 6 cepas VNI não sofreram ação fungicida (TK>72). A maioria dos isolados VNII (64,7%) apresentou TK24. Os 3 isolados VGII sofreram atividade fungicida a partir de TK24. A maioria dos isolados VNI, VNII e todos os isolados VGII apresentaram alto NHF (>32mg/L). Diferença no NHF de acordo com os genótipos foi observada (p=0,005). No modelo múltiplo, as variáveis associadas significativamente ao óbito foram: idade em anos (OR=1,08;IC95%=1,02-1,15), contagem de leveduras no líquido cefalorraquidiano em logaritmo (LCR) (OR=1,66;IC95%=1,21-2,28) e uma variável composta por hipertensão arterial sistêmica ou diagnóstico de edema cerebral ou dilatação ventricular por tomografia (OR=35,68;IC95%=4,97-256,31). Para o desfecho composto, as variáveis associadas foram: contagem de leveduras do 1D em logaritmo (OR=1,50; IC95%=1,20-1,86; p=<0,001), cultura de sangue positiva para *Cryptococcus* spp. (OR=3,30; IC95%=0,86-12,59; p=0,08) e descrição de neurotoxoplasmose (OR=18,62; IC95%=1,85-187,5; p=0,01). As associações foram consistentes em modelos de sobrevida.

Conclusão: Foi possível descrever genótipos mais frequentes e identificar fatores genéticos, como aumento da expressão de genes e bombas de efluxo, relacionados à resistência aos fármacos. Nenhum dos testes de suscetibilidade esteve associado com os desfechos. Variáveis obtidas nos primeiros dias de internação mostraram utilidade para prever o prognóstico em pacientes com meningite criptocócica. Estes preditores podem ajudar a identificar os casos com maior potencial de óbito e que necessitam da otimização dos recursos terapêuticos.

Descritores: Criptococose; *Cryptococcus neoformans*; *Cryptococcus gattii*; antifúngicos; prognóstico, Saúde Pública

ABSTRACT

Background: Cryptococcal meningitis causes high mortality in immunocompromised patients. The objective of this study was to identify the phenomena of low susceptibility to antifungal and other clinical predictors that may explain therapeutic failure and relapse of neurocryptococcosis

Methodology: It was analyzed 96 cases with clinical and epidemiological data. The respective isolates were identified for genotype, susceptibility profile by Minimal Inhibitory Concentration (MIC), FCZ heteroresistance level (NHF), and time to death determination against 1 mg / L BMA (Time-Kill, TK). We isolated heteroresistant DNA expression analysis by real-time PCR, expression of efflux pumps by flow cytometry and, some isolates tolerant to AMB were selected to study resistance to oxidative stress. Univariable and multiple analyses using logistic regression were performed to identify predictors of in-hospital mortality and a composed outcome defined by death, referral to the intensive care unit and relapse 6 months after hospital discharge.

Results: Most of the patients were immunocompromised, with CD4 range from 2 to 722 cells/mm³ and 96.7% patients HIV-positive. It was analyzed 93 strains of *Cryptococcus neoformans* of which 76 were genotype VNI and 17 were VNII and 3 were *C. gattii*, all were VGII. AMB MIC ranged from 0.012 to 0.94 mg/L and FCZ MIC were between 0.12 and 64 mg/L. Resistance to FCZ (MIC $\geq$ 16mg/L) was higher to VNI than VNII (p=0.03). Among the VNI strains, 64.5% had fungicidal activity up to 24h (TK24) of exposure to AMB and 6 VNI did not present this activity until 72h (TK> 72). Most VNII strains (64.7%) had TK24. The 3 VGII strains presented fungicidal activity from TK24. According to the MIC, all strains were susceptible to AMB. The majority of VNI strains (93.4%) and VNII (76.5%) and 3 VGII strains showed high NHF ($\geq$ 32mg/L) and it was observed statistical difference according to the genotypes VNI and VNII (p=0.005). At the multiple analysis, the variables significantly associated with the death were the age in years (OR=1.08,95%CI=1.02-1.15), the cerebrospinal fluid (CSF) yeasts count-log (OR=1.66,95%CI=1.21-2.28), and a variable composed of systemic arterial hypertension or diagnosis of cerebral edema or ventricular dilatation by tomography (OR=35.68,95%CI=4.97-256.31). At the composed outcome, the variables associated were: CSF yeasts count-log (OR=1,50; IC95%=1,20-1,86; p=<0,001), positive blood culture for *Cryptococcus* spp. (OR=3,30; IC95%=0,86-12,59; p=0,08) and neurotoxoplasmosis (OR=18,62; IC95%=1,85-187,5; p=0,01). The associations were consistent at survival models.

Conclusion: It was possible to describe more frequent genotypes and to identify genetic factors, such as increased gene expression and efflux pumps, related to drug resistance. The antifungal susceptibilities were not associated with the outcomes. Variables available in the first days of hospitalization showed utility to predict the prognosis in patients with cryptococcal meningitis. These predictors can help to identify the cases with higher potential of death and that require the optimization of the therapeutic resources.

Descriptors: cryptococcosis; cryptococcal meningitis; *Cryptococcus neoformans*; *Cryptococcus gattii*; antifungals; prognosis, Public Health

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC: *ATP binding cassette transporter*
AFST: *Antifungal susceptibility testing*
ATCC: *American Type Culture Collection*
AIDS: *Acquired Immunodeficiency Syndrome*
AMB: anfotericina B
C. gattii: *Cryptococcus gattii*
C. neoformans: *Cryptococcus neoformans*
CGB: cavanina, glicina e azul de bromotimol
CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*
CC: controle de crescimento
cm: centímetros
CONEP: Conselho Nacional de Ética em Pesquisas
dL: decilitro
DMSO: dimetilsulfóxido
DNA: *deoxyribonucleic acid*
EDTA: ácido etileno diamino tetracético
EUCAST: *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing*
et al.: *et aluminii*
FCZ: fluconazol
FIOCRUZ-RJ: Fundação Oswaldo Cruz- Rio de Janeiro
g: grama
HAART: *Highly Active Antiretroviral Therapy*
HAS: hipertensão arterial sistêmica
HCl: ácido clorídrico
hFCZ: heterorresistente ao FCZ
HIV: *Human Immunodeficiency Virus*
HR: *hazard ratio*
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
IAL: Instituto Adolfo Lutz
IC: intervalo de confiança
IIER: Instituto de Infectologia Emilio Ribas
IIQ: intervalo interquartil
L: Litro
LCR: líquido cefalorraquidiano
log: escala de logaritmo natural mais uma unidade
MFI: *Median Fluorescence Intensity*
MFS: *major facilitator superfamily*
MG: média geométrica
mg: miligrama
mm³= milímetro cúbico
MIC: *Minimal Inhibitory Concentration*

mg: miligrama
mL: mililitro
MOPS: ácido morfolinopropanosulfônico
ng: nanograma
NHF: nível de heteroresistência ao fluconazol
OR: Odds ratio
PBS: Phosphate buffered saline
PCR: Polymerase Chain Reaction
pg: picograma
pH: potencial hidrogeniônico
RFLP: Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA: ribonucleic acid
ROC: receiver operating characteristic
rpm: rotações por minuto
RPMI: Roswell Park Memorial Institute
SAME: Serviço de arquivo médico e estatístico
sf: sem fluorescência
SIGH: Sistema de informação hospitalar
tAMB: tolerante à AMB
TBE: Tris base, ácido bórico e EDTA
TE: tris base e EDTA
TK: *Time-Kill*
UFC: unidades formadoras de colônias
UNIFESP: Universidade Federal de São Paulo
USP: Universidade de São Paulo
UTI: unidade de terapia intensiva
WM: Westmead Millennium Institute
WHO: World Organization Health
YPD: yeast peptone dextrose
1D: 1º dia de internação
7D: 7º dia de internação
14D: 14º dia de internação
21D: 21º dia de internação
28D: 28º dia de internação
5FC: 5-fluorocitosina
µg: micrograma
µL: microlitro

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Foto de placa de microdiluição usada no teste de suscetibilidade ao fluconazol para determinação da concentração inibitória mínima (MIC)39
- Figura 2** - Foto de um de teste de suscetibilidade por Etest® de *C. neoformans* frente à anfotericina B.....40
- Figura 3** - Foto da leitura do teste para determinação da atividade fungicida pelo teste de Curvas de morte com 1mg/L de anfotericina B.....42
- Figura 4** - Foto do teste para determinação do nível de heterorresistência ao fluconazol com a cepa *C. neoformans* H99.....44
- Figura 5** - Histograma da frequência acumulada em porcentagem de 96 isolados clínicos de *Cryptococcus* spp., de acordo com a concentração inibitória mínima (MIC) de anfotericina B, provenientes de LCR de pacientes com neurocriptococose e internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017).....56
- Figura 6** - Histograma da frequência acumulada em porcentagem de 96 isolados clínicos de *Cryptococcus* spp., de acordo com a concentração inibitória mínima (MIC) de fluconazol, provenientes de LCR de pacientes com neurocriptococose e internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017).....57
- Figura 7** - Histograma da frequência acumulada em porcentagem de 96 isolados clínicos de *Cryptococcus* spp., de acordo com o tempo de morte (TK) frente 1mg/L de anfotericina B, provenientes de amostras de LCR de pacientes com neurocriptococose e internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017).....59
- Figura 8** - Gráfico referente às curvas de morte de 13 isolados de *C. neoformans* que apresentaram crescimento após aparente ação fungicida de 1mg/L de anfotericina B.....59
- Figura 9** - Foto do experimento de estresse oxidativo com H₂O₂.....60
- Figura 10** - Gráfico referente às curvas de crescimento para a cepa *C. neoformans* H99 e sua subpopulação tolerante a 1 mg/L de anfotericina B (AMB) em diferentes concentrações.....61
- Figura 11** - Foto de microscopia ótica de células de *Cryptococcus neoformans*, provenientes da cepa H99 e de um isolado clínico, e de suas subpopulações heterorresistentes ao fluconazol.....62
- Figura 12** - Expressão de rodamina 6G por citometria de fluxo da cepa *Cryptococcus neoformans* H99, para análise do funcionamento das bombas de efluxo de acordo com o acúmulo de fluorescência nas subpopulações de células heterorresistentes ao fluconazol (hFCZ) e na população original.....64

Figura 13 - Box plot da mediana da intensidade de fluorescência (MFI) de rodamina 6G de 11 isolados clínicos de <i>C. neoformans</i> (isolados originais) e suas respectivas subpopulações de células heterorresistentes ao fluconazol (hFCZ).....	65
Figura 14 - Gráficos das variáveis quantitativas associadas ao óbito hospitalar determinadas no 1º dia de internação para análise da evolução da Odds.....	70
Figura 15 - Figura referente ao padrão de distribuição das observações, influentes e <i>outliers</i> , determinados pelo modelo de análise múltipla para óbito hospitalar.....	73
Figura 16 - Curva ROC utilizando as variáveis idade, contagem de leveduras no LCR no 1D, e HAS/CNTC de 96 pacientes com neurocriptococose internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012 a 12/2013 e 01/2015 a 08/2017)...	74
Figura 17 - Curvas de sobrevida até a ocorrência do óbito hospitalar, de acordo com as variáveis selecionadas para o modelo de análise múltipla.....	75
Figura 18 - Gráficos das variáveis quantitativas associadas ao desfecho composto, determinadas no 1º dia de internação para análise da evolução da Odds.....	80
Figura 19 - Figura referente ao padrão de distribuição das observações, influentes e <i>outliers</i> , determinados pelo modelo de análise múltipla para o desfecho composto.....	82
Figura 20 - Curva ROC utilizando as variáveis associadas ao desfecho composto em 89 pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/ 2015-08/2017)	84
Figura 21 - Curvas de sobrevida até a ocorrência de um dos eventos do desfecho composto, de acordo com as variáveis selecionadas para o modelo de análise múltipla.....	85

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sorotipos e tipos moleculares segundo técnica de PCR-RFLP de <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>C. gattii</i> . Adaptado de MEYER et al., 1999).....	20
Quadro 2 - Pares de <i>primers</i> usados para a reação de PCR e sequenciamento de DNA dos isolados de <i>C. neoformans</i> VNI para estudo de mecanismos de heterorresistência ao FCZ por aneuploidia cromossômica.....	44
Quadro 3 - Pares de <i>primers</i> e sondas Taqman® usados para a reação de PCR em Tempo Real dos isolados de <i>C. neoformans</i> VNI para estudo de mecanismos de heterorresistência ao FCZ por aneuploidia cromossômica (SIONOV et al., 2010).....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Informações sobre sintomas relatados na hospitalização em 90 pacientes de neurocriptococose, internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)	49
Tabela 2 - Principais comorbidades registradas durante a internação em 90 pacientes de neurocriptococose internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017).....	50
Tabela 3 - Resultados de exames de imagem do sistema nervoso central de 90 pacientes com neurocriptococose, internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017).....	51
Tabela 4 - Resultados de pressão de abertura de LCR e ocorrência de hipertensão intracraniana de pacientes com neurocriptococose internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017).....	52
Tabela 5 -Resultados do teste de aglutinação em látex, exame de tinta da China e cultura realizados em amostras de LCR de 90 pacientes com neurocriptococose internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017).....	52
Tabela 6 – Resultados do exame de contagem de células de leveduras no LCR realizados em 90 pacientes com neurocriptococose internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017).....	53
Tabela 7 - Resultados de dosagem de glicose, proteínas e celularidade total em LCR, realizadas em 90 pacientes com neurocriptococose internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017).....	53
Tabela 8 - Resultados de dosagens de creatinina e ureia no sangue de 90 pacientes com neurocriptococose, no 1º, 7º e 14º dias de internação no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015- 08/2017).....	54
Tabela 9 - Valores de concentração inibitória mínima (MIC) de anfotericina B de acordo com os genótipos de <i>Cryptococcus</i> spp., isolados de LCR de pacientes com neurocriptococose e internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)	55
Tabela 10 - Valores de concentração inibitória mínima (MIC) de fluconazol, de acordo com os genótipos de <i>Cryptococcus</i> spp., isolados de LCR de pacientes com neurocriptococose internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017).....	56
Tabela 11 - Tempo necessário para a atividade fungicida de 1mg/L de anfotericina B, por Curvas de Morte, de acordo com os genótipos de <i>Cryptococcus</i> spp., isolados de LCR de pacientes com neurocriptococose internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015- 08/2017).....	57

Tabela 12 - Valores de nível de heterorresistência (NHF) ao fluconazol de acordo com os genótipos de <i>Cryptococcus</i> spp., isolados de LCR de pacientes com neurocriptococose internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017).....	60
Tabela 13 - Resultados da PCR em Tempo Real para quantificação de DNA e determinação de duplicação dos cromossomos 1 e 4 de 22 isolados clínicos de <i>C. neoformans</i> ...	62
Tabela 14 - Resultados do experimento de acúmulo de rodamina 6G para análise de expressão de bombas de efluxo em 11 isolados clínicos de <i>C. neoformans</i> e suas subpopulações de células heterorresistentes ao fluconazol.....	64
Tabela 15 Análise univariável de genótipo, resistência a FCZ, tolerância à AMB e alto nível de heterorresistência ao FCZ, em relação ao óbito hospitalar, de pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017).....	65
Tabela 16 - Análise univariável das variáveis categóricas de prognóstico e que apresentaram p-valor $\leq 0,20$, em relação ao óbito hospitalar, dos pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017).....	66
Tabela 17 - Análise univariável das variáveis quantitativas que apresentaram p-valor $\leq 0,20$ e de importância clínica epidemiológica, em relação ao óbito hospitalar, dos pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)	67
Tabela 18 - Análise univariável das variáveis quantitativas associadas ao óbito hospitalar de pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017).....	68
Tabela 19 - Análise univariável das variáveis categóricas associadas ao óbito hospitalar de 96 pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-2/2013 e 01/2015-08/2017).....	70
Tabela 20 - Análise múltipla por Regressão Logística das variáveis associadas ao óbito hospitalar em 90 pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017).....	71
Tabela 21 - Análise múltipla por Regressão Logística, sem as observações influentes, das variáveis associadas ao óbito hospitalar em 87 pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017).....	73
Tabela 22 - Análise múltipla por Regressão Logística sem os <i>outliers</i> , das variáveis associadas ao óbito hospitalar em 85 pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017).....	73
Tabela 23 - Análise de regressão de Cox das variáveis usadas no modelo de Regressão Logística, associadas ao óbito hospitalar de 90 pacientes internados por	

neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017).....	74
Tabela 24 - Análise univariável das variáveis: genótipo, resistência a FCZ, tolerância à AMB e alta heterorresistência ao FCZ, em relação à ocorrência de um dos eventos descritos no desfecho composto, em pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-02/2013 e 01/2015-08/2017).....	76
Tabela 25 - Análise univariável das variáveis categóricas de prognóstico e que apresentaram p -valor $\leq 0,20$ em relação a ocorrência de um dos eventos do desfecho composto nos pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017).....	77
Tabela 26 - Análise univariável das variáveis quantitativas que apresentaram p -valor $\leq 0,20$ e de importância clínica epidemiológica em relação a ocorrência de um dos eventos do desfecho composto nos pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)...	78
Tabela 27 - Análise univariável das variáveis quantitativas associadas ao desfecho composto em pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017).....	79
Tabela 28 - Análise univariável das variáveis categóricas associadas a ocorrência de um dos eventos descritos no desfecho composto nos pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017).....	80
Tabela 29 - Análise múltipla por Regressão Logística das variáveis associadas ao desfecho composto em 89 pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017).....	81
Tabela 30 - Análise múltipla por Regressão Logística sem as observações influentes, das variáveis associadas ao desfecho composto em 80 pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017).....	82
Tabela 31 - Análise múltipla por Regressão Logística sem os <i>outliers</i> , das variáveis associadas ao desfecho composto nos pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017).....	82
Tabela 32 - Análise de regressão de Cox das variáveis usadas no modelo de Regressão Logística, associadas à ocorrência de um dos eventos descritos no desfecho composto, em 89 pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017).....	83

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	A DOENÇA	18
1.2	AGENTES DA CRIPTOCOCOSE.....	19
1.3	TRATAMENTO DA CRIPTOCOCOSE	21
1.3.1	AMB.....	22
1.3.2	FCZ	23
1.3.3	5FC.....	23
1.4	RESISTÊNCIA DE <i>C. NEOFORMANS</i> E <i>C. GATTII</i> A ANTIFÚNGICOS	24
1.4.1	Suscetibilidade <i>In Vitro</i> de Antifúngicos	27
1.4.2	Ação Fungicida de AMB por Metodologia de Curvas de Morte	28
1.4.3	Heterorresistência ao Fluconazol	28
1.5	JUSTIFICATIVA.....	29
2	OBJETIVOS.....	30
2.1	OBJETIVO GERAL	30
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	31
3.2	DESENHO DE ESTUDO	31
3.3	PERFIL DO HOSPITAL	31
3.4	POPULAÇÃO DO ESTUDO	32
3.5	COLETA DE DADOS E INFORMAÇÕES CLÍNICAS	32
3.6	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	33
3.7	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	33
3.8	ISOLADOS DE <i>CRYPTOCOCCUS SPP.</i>	34
3.8.1	Extração de DNA Genômico	34
3.8.2	Determinação dos Genótipos	36
3.8.3	Determinação da Suscetibilidade ao FCZ.....	37
3.8.4	Determinação da Suscetibilidade à AMB	38
3.8.5	Estudo da Atividade Fungicida de AMB	39
3.8.6	Testes de Curvas de Morte por AMB	39
3.8.7	Investigação do Fenômeno de Tolerância à AMB.....	41
3.8.8	Determinação do NHF	42
3.8.9	Investigação do Fenômeno de Heterorresistência ao FCZ.....	43
3.9	ANÁLISE DOS DADOS	46
3.9.1	Caracterização dos isolados	46
3.9.2	Fatores Associados ao Prognóstico	47
3.10	PROGRAMAS UTILIZADOS	48
4	RESULTADOS	49
4.1	PACIENTES	49
4.2	ISOLADOS DE <i>CRYPTOCOCCUS SPP.</i>	54
4.2.1	Genótipos e Perfil de Suscetibilidade aos Antifúngicos	54

4.2.2	Determinação da Tolerância a AMB por Curvas de Morte	57
4.2.3	Estudo de estresse oxidativo em isolados tolerantes a AMB	59
4.2.4	Determinação do NHF	60
4.2.5	Determinação de expressão de DNA de células hFCZ	61
4.2.6	Expressão de bombas de efluxo na vigência de heterorresistência ao FCZ por citometria de fluxo	62
4.3	FATORES ASSOCIADOS AO PROGNÓSTICO	65
4.3.1	Análise univariável em relação à mortalidade hospitalar	65
4.3.2	Análise múltipla para desfecho simples de óbito hospitalar	71
4.3.3	Análise univariável em relação ao desfecho composto.....	76
4.3.4	Análise múltipla para desfecho composto.....	80
5	DISCUSSÃO.....	85
5.1	LIMITAÇÕES DO ESTUDO	96
6	CONCLUSÕES.....	98
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
8	APENDICE	116
9	ANEXOS	135
10	ARTIGO SUBMETIDO.....	151
11	CURRICULOS	168

1 INTRODUÇÃO

1.1 A DOENÇA

A criptococose, micose sistêmica causada por leveduras do gênero *Cryptococcus*, é uma das principais doenças invasivas em humanos. É adquirida por meio da inalação de propágulos fúngicos dispersos no ambiente, que são depositados nos alvéolos pulmonares podendo causar infecção pulmonar. As células fúngicas podem disseminar, por via hematogênica, para tecido cutâneo, órgãos internos e sistema nervoso central, onde se observa a forma clínica mais comum e letal da doença, conhecida como neurocriptococose, ou meningite criptocócica (LIN e HEITMAN, 2006).

A espécie de *Cryptococcus* associada às condições de imunossupressão, principalmente à aids, é quase exclusivamente *C. neoformans*. Já *C. gattii* infecta indivíduos aparentemente imunocompetentes, provavelmente devido a uma maior virulência (ELLIS e PFEIFFER, 1990; MONTENEGRO e PAULA, 2000; NGAMSKULRUNGROJ e MEYER, 2009). Devido às diferenças na apresentação clínica e a fatores relacionados aos agentes etiológicos, as lesões apresentadas por *C. neoformans* caracterizam-se como pneumonia multifocal e meningite e meningoencefalite, enquanto que maiores complicações são observadas na infecção causada por *C. gattii*, como formas pulmonares graves com lesões focais e massas fúngicas, os criptococomas, no pulmão e cérebro. A presença dos criptococomas pode dificultar o acesso dos fármacos aos sítios da infecção e prolongar a terapia. Além disso, intervenção cirúrgica para retirada dos criptococomas são requeridos com frequência nestes casos, o que pode gerar maiores danos neurológicos (CHEN et al., 2000; JAIN et al., 2005; DIXIT et al., 2009; SEVERO et al., 2009; GALANIS, 2010).

A criptococose é uma das infecções oportunistas definidoras de aids e até o advento da terapia antirretroviral de alta potência era uma das principais causas de óbito nestes pacientes. Ainda que a incidência global da criptococose tenha diminuído, sua ocorrência e mortalidade são altas nestes pacientes em algumas áreas do mundo, incluindo o Brasil (VALLE, 2006; PAPPALARDO et al., 2007; PAPPALARDO et al., 2009; MORA et al., 2012; DOMINGUES e WALDMAN, 2014; WHO, 2018). Em 2009, eram estimados em torno de 957 mil casos anuais de meningite por *Cryptococcus* spp. em pessoas portadoras do vírus HIV, resultando em mais de 600 mil mortes, principalmente na África Subsaariana (PARK et al., 2009).

Estimativas mais recentes, com base laboratorial de antigenemia, apontam que em 2014 ocorriam mais de 223 mil casos da doença associada à aids no mundo, resultando em pouco mais de 181 mil mortes, anualmente (RAJASINGHAM et al., 2017).

É notável que o acesso à terapia antirretroviral e ao diagnóstico precoce têm efeito positivo nesta redução da mortalidade por criptococose em pessoas vivendo com HIV/aids, no entanto a letalidade depende de diversos fatores, entre eles: doença de base, fase do diagnóstico da doença, agente etiológico e estratégia terapêutica. Ainda assim, permanece como a segunda causa mais comum de mortalidade associada à aids, ocasionando no óbito de, em média, 15% dessa população (RAJASINGHAM et al., 2017). Em países desenvolvidos, a criptococose apresenta letalidade em torno de 9% a 20%, e em países em desenvolvimento esta taxa é de aproximadamente 40% (PARK et al., 2009; PYRGOS et al., 2013; WHO, 2018; CORBETT et al., 2002; JARVIS et al., 2014; WHO, 2018).

Devido à criptococose não ser uma doença de notificação compulsória, é difícil definir o número de casos e de óbitos relacionados à micose, contudo, a taxa de letalidade em pessoas vivendo com HIV/aids varia de 30% a 70% no Brasil (PAPPALARDO et al., 2007; MORA et al., 2012; MASCARENHAS-BATISTA et al., 2013; VIDAL et al., 2013; AGUIAR et al., 2017; AZAMBUJA et al., 2018; NUNES et al., 2018).

No entanto, fatores relacionados aos agentes etiológicos, ainda não completamente elucidados, podem contribuir para a evolução da doença e reforçam a necessidade de estudos sobre a patogênese da criptococose (PARK et al., 2009).

1.2 AGENTES DA CRIPTOCOCOSE

No gênero *Cryptococcus* existem aproximadamente 37 espécies descritas, compreende leveduras que se dividem por brotamento e que são circundadas por cápsula formada de polissacarídeos (MITCHELL e PERFECT, 1995; CHAYAKULKEEREE e PERFECT, 2006). Foi descrito pela primeira vez em 1894, na Universidade de Geifswald na Alemanha pelo patologista Otto Busse e médico Abharam Buschke. A levedura, observada em lesão na tíbia de uma mulher de 31 anos, foi isolada, inoculada em animais e então confirmada como o agente causador da infecção (FREIJ e FREIJ, 2015).

Até o início do milênio, o principal agente *C. neoformans*, era dividido em duas variedades e cinco sorotipos, denominados: A, B, C, D e AD. A classificação em sorotipos

tem como base, as diferenças antigênicas dos polissacarídeos que compõe a cápsula. Os sorotipos A, D e AD referiam-se a *C. neoformans* variedade *neoformans* e os sorotipos B e C à *C. neoformans* variedade *gattii*. A diversidade do DNA levou à criação de uma terceira variedade - *C. neoformans* variedade *grubii*-, proposta para acomodar os isolados do sorotipo A (FRANZOT et al., 1999). Devido a diferenças epidemiológicas, ecológicas e bioquímicas, KWON-CHUNG e VARMA (2006) propuseram uma nova classificação desses agentes em duas espécies: *C. neoformans* e *C. gattii*.

MEYER et al., (1999, 2003), por metodologias de *DNA-Fingerprinting* e *Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP), subdividiram as espécies *C. gattii* e *C. neoformans* em quatro tipos cada, sendo: VGI, VGII, VGIII, VGIV e VNI, VNII, VNIII e VNIV (Quadro 1). Um novo tipo foi descrito em Botswana, recebendo denominação VNB (LITVINTSEVA et al., 2011). Os tipos moleculares diferem em suas características epidemiológicas e ecológicas, apresentações clínicas e resposta terapêutica e distribuição geográfica (BYRNES et al., 2010; MARTINS et al., 2011; TRILLES et al., 2012; BEALE et al., 2015). Por exemplo, tipo VNI é o mais frequente em todo o mundo, incluindo o Brasil, e o tipo VNII e híbridos *C. neoformans/C. gattii*, são raros, porém, descritos em todos os continentes. O tipo VGII apresenta alta frequência em isolados brasileiros (COGLIATI, 2013; FIRACATIVE et al., 2018; NISHIKAWA et al., 2019).

Quadro 1- Sorotipos e tipos moleculares de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* segundo técnica de *Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) (MEYER et al., 1999).

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

Recentemente foi proposta a divisão de *C. neoformans* e *C. gattii* em 7 espécies, com base em características fenotípicas, genotípicas, epidemiológicas e de virulência sendo: *C. neoformans* para os isolados de genótipos VNI, VNII e VNB (antigo *C. neoformans* variedade *grubii*) e *C. deneoformans* para VNIV (antigo *C. neoformans* var. *neoformans*); *C. gattii* para VGI, *C. deuterogatti* para VGII, *C. bacillisporus* para VGIII e *C. tetragattii* para VGIV

(HAGEN et al., 2015). No entanto, até o momento, poucos estudos têm aderido à esta nomenclatura, sendo comumente utilizada, ainda, a classificação de *C. neoformans* e *C. gattii*.

A espécie *C. neoformans* tem como habitat o solo com pH alcalino e rico em nitrogênio, condições encontradas onde há fezes de aves, como pombos, perus, gaivotas. O trato intestinal dessas aves é reservatório para a levedura e, no Brasil, importantes trabalhos demonstraram a alta frequência do fungo em ambientes urbanos (BARONI et al., 2006; ROSARIO et al., 2008).

C. gattii foi primeiramente isolada na região do sul da Austrália, de amostras provenientes da árvore *Eucalyptus camaldulensis* (SORRELL e ELLIS, 1997). No Brasil, importantes estudos demonstraram a presença desta espécie em ocos de árvores *Syzygium jambolana*, *Cassia grandis*, *Senna multijuca* e *Ficus microcarpa* (LAZERA et al., 1993; LAZERA et al., 1998; FORTES et al., 2001; BARRETO DE OLIVEIRA et al., 2004; COSTA et al., 2009). Esta espécie é endêmica do norte e nordeste do Brasil e estudos recentes mostram que genótipos VGII destas regiões, considerado hipervirulento, são provavelmente os responsáveis pela origem ancestral deste agente (SOUTO et al., 2016). Até a década passada, *C. gattii* era considerado um patógeno tropical e subtropical (KWON-CHUNG e BENNETT, 1984). No entanto, a emergência de criptococose causada por *C. gattii* VGII em casos humanos e animais na Ilha de Vancouver, Canadá, e sua disseminação para a região de British Columbia e áreas adjacentes ao oceano Pacífico nos Estados Unidos, quebrou esse paradigma (FRASER et al., 2003; KIDD et al., 2004; BYRNES et al., 2010). Do mesmo modo, *C. gattii* foi descrito como agente causal de doença humana em países de clima temperado como Espanha, Itália e Grécia (DROMER et al., 1996; HOANG, 2004; VIVIANI et al., 2006; LOCKHART et al., 2013).

1.3 TRATAMENTO DA CRIPTOCOCOSE

A escolha do tratamento depende da imunidade e doença de base do paciente, do sítio de infecção e da toxicidade do antifúngico (PERFECT et al., 2010; WHO, 2018).

O tratamento recomendado para pacientes portadores do HIV é dividido em fases de indução, consolidação e manutenção, cuja duração pode variar conforme a evolução clínica. Uma das formas indicadas consiste no tratamento por pelo menos uma semana com combinação de 1,0mg/kg/dia de anfotericina B (AMB) e 1,0mg/kg/dia de 5-fluorcitossina

(5FC) e seguida por uma semana de 1200mg/dia de fluconazol (FCZ) na fase de indução, 800mg/dia de FCZ por 8 semanas de terapia de consolidação e completada com 200mg/dia de fluconazol na terapia de manutenção. Contudo, regimes alternativos também são recomendados, dependendo da disponibilidade dos fármacos, idade do paciente ou doença de base, como o uso de 1,0mg/kg/dia de AMB e 1200mg/dia de FCZ ou 1200mg/dia de FCZ e 100mg/kg/dia de 5FC, por pelo menos duas semanas na fase de indução (JARVIS et al., 2010; PERFECT et al., 2010; WHO, 2018).

1.3.1 AMB

AMB faz parte do grupo de antibióticos macrolídeos poliênicos. Desenvolvido na década de 50, seu mecanismo de ação consiste na ligação ao ergosterol, presente na membrana citoplasmática dos fungos, retirando-o da membrana celular. Esta interação provoca a formação de poros e canais, aumentando a permeabilidade celular, interferindo nas funções de transporte, causando perturbações metabólicas como o desequilíbrio de íons K^+ e consequente morte por lise e morte celular (ANDERSON et al., 2014). Este mecanismo explica sua alta atividade fungicida, entretanto, a AMB possui também alta toxicidade, em especial, para as células renais. Este efeito é causado pela alta similaridade entre o ergosterol fúngico e o colesterol, permitindo que o fármaco aja também nas células dos seres humanos e, portanto, apesar de eficaz contra a levedura, sua utilização é restrita e deve ser avaliada levando em consideração alterações renais e hepáticas (BAGNIS e DERAY, 2012; RICHARDSON e WARNOCK, 2012; PERFECT, 2017). No entanto, recentemente foram criadas formulações lipossomais desse fármaco que reduzem esses efeitos tóxicos, e dessa forma, AMB começa ganhar ainda mais espaço no tratamento da criptococose em todo o mundo, tanto monoterapia, quanto em terapias combinadas com outros antifúngicos (LIMPER et al., 2011; BRATTON et al., 2013). A ação oxidativa sobre a célula fúngica também é um importante mecanismo fungicida do polieno (MESA-ARANGO et al., 2014).

1.3.2 FCZ

Por algum tempo, AMB foi o único fármaco sistêmico com ação antifúngica. Na década de 70, a busca por fármacos menos tóxicos levou ao desenvolvimento da classe de antifúngicos atualmente utilizados para o tratamento de criptococose, os azóis. Devido a menor toxicidade em comparação a AMB e eficácia desses antifúngicos frente à maioria dos quadros clínicos, o FCZ e o voriconazol são fármacos amplamente utilizados (GHANNOUM e RICE, 1999).

Os fármacos triazólicos inibem a 14-alfa lanosterol demetilase, enzima do citocromo P450 que é codificada pelo gene *ERG11* (CANNON et al., 2009). Essa ação implica em uma interferência na cadeia de produção do ergosterol, necessariamente ao impedir a conversão de lanosterol a ergosterol, imprescindível para a estruturação da membrana plasmática e crescimento celular do fungo. A ausência de ergosterol confere, assim, ação fungistática aos triazóis e com isso ocorre o acúmulo dos esteróis precursores de ergosterol, que são tóxicos e podem levar à ação fungicida desses fármacos (DENNING e HOPE, 2010).

Outro triazol, o itraconazol, age de forma semelhante, contudo não é utilizado para tratamento de quadros clínicos sistêmicos devido à farmacocinética e farmacodinâmica desfavorável nesses casos (ESPINEL-INGROFF, 2009).

1.3.3 5FC

A 5FC, ou flucitosina, é um fármaco do grupo de nucleotídeos pirimidínicos e é utilizado desde a década de 70 para tratamento de micoses sistêmicas. O mecanismo de ação consiste na conversão deste fármaco, por compostos enzimáticos produzidos pelo fungo, em metabólicos. Esses, por sua vez, podem ser incorporados a cadeia de RNA no lugar de um nucleotídeo, apenas na célula fúngica, causando distúrbios na síntese de proteínas além de inibir enzimas responsáveis pela síntese de DNA (VERMES, 2000; ODDS et al., 2003). No entanto, são relatadas altas taxas de resistência a 5FC, tanto *in vitro* quanto *in vivo* e, dessa forma, essa droga não é usada como monoterapia, sendo indicada como coadjuvante na terapia com AMB nos casos de meningite criptocócica (DING et al., 1997;

KANTARCIOGLU e YUCEL, 2002; WHO, 2018). No Brasil, o fármaco não é disponibilidade pelo Sistema Único de Saúde.

1.4 RESISTÊNCIA DE *C. NEOFORMANS* E *C. GATTII* A ANTIFÚNGICOS

A falha na terapia pode muitas vezes ser resultado da ausência de atividade antifúngica devido à resistência do microrganismo aos fármacos. A resistência pode ser intrínseca, ou seja, natural do próprio microrganismo ou, adquirida, devido a mecanismos de adaptação desenvolvidos pelo fungo, após exposição ao fármaco, fazendo com que o mesmo permaneça no hospedeiro causando a infecção (PEMÁN e CANTÓN; ESPINEL-INGROFF, 2009; DELARZE e SANGLARD, 2015).

Apenas resistência adquirida à AMB foi descrita para *Cryptococcus* spp. até o momento (DICK et al., 1980; WALSH e PIZZO, 1988). Mutações na via de biossíntese do ergosterol podem resultar em células com alterações na composição dos esteróis da membrana celular e, conseqüentemente, gerando células resistentes devido à baixa afinidade do fármaco ao seu alvo (POWDERLY, 1988; KELLY et al., 1994; JOSEPH-HORNE et al., 1995). O aumento de enzimas do sistema antioxidante, como catalase e peroxidase, podem contribuir com a resistência por impedir que os danos oxidativos sejam causados pela AMB (SOKOL-ANDERSON et al., 1988).

A melanização, desenvolvida durante o processo de infecção e importante fator de virulência e de integridade celular, também pode influenciar na atividade antifúngica da AMB. A melanina é depositada na parede celular e age como um mecanismo de proteção durante a invasão e colonização no hospedeiro, protegendo contra a fagocitose por macrófagos e contra agentes oxidantes como a AMB (WANG et al., 1995; KRESS et al., 2001; NOSANCHUK e CASADEVALL, 2006). A melanina reduz a eficiência deste fármaco, por impedir que este chegue ao seu alvo e reduzindo sua ligação ao ergosterol na membrana (EISENMAN et al., 2005). No entanto, este mecanismo pode ser observado apenas quando utilizados métodos de determinação de atividade fungicida. Células melanizadas e não melanizadas apresentaram valores de *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC-Concentração Inibitória Mínima) de AMB semelhantes, no entanto, por testes de determinação de atividade fungicida, como o método de Curvas de morte, foi possível observar apenas células

melanizadas viáveis, mesmo em períodos maiores de incubação com o fármaco (VAN DUIN et al., 2002; IKEDA et al., 2003). Outro fator de virulência importante, a cápsula mucopolissacarídica, pode apresentar mecanismo semelhante ao proteger as células de *Cryptococcus* spp. contra a atividade da AMB (ZARAGOZA et al., 2008). Isolados clínicos após indução *in vitro* de produção de cápsula apresentaram maiores valores de MIC de AMB e menor atividade fungicida frente 1 µg/mL de AMB, em comparação com os mesmo isolados não induzidos (CÓRDOBA et al., 2011; VITALE et al., 2012).

A resistência a azóis, em pacientes sob tratamento com FCZ, é frequentemente associada a episódios de recidiva da criptococose (ALLER et al., 2000; RODERO et al., 2003; CHEONG e MCCORMACK, 2013). Isto acontece devido a exposição prévia e prolongada ao fármaco, ocasionando na resistência adquirida, ou em razão da seleção de células com baixa suscetibilidade ao antifúngico (JOSEPH-HORNE et al., 1995; BARCHIESI et al., 2000; SMITH et al., 2015). Esta forma de resistência é associada principalmente à terapia de manutenção, leva ao aparecimento de isolados multirresistentes, falha terapêutica e recidivas em criptococose e pode ser interpretada como resistência clínica ao FCZ (ALVES et al., 1997; PERFECT; COX, 1999; ALLER et al., 2000; AGUDELO et al., 2015; NASRI et al., 2016).

Os mecanismos de resistência mais descritos em *Cryptococcus* são baseados na alteração da enzima alvo 14- α -lanosterol demetilase ou na sua superexpressão. Esta enzima é codificada pelo *ERG11*, presente no cromossomo 1, e mutações neste gene ocasionam alterações de aminoácidos desta proteína, gerando modificações estruturais na enzima alvo, o que diminui sua afinidade aos azóis, principalmente ao FCZ (PFALLER, 2012; SAGATOVA et al., 2016; SANGLARD, 2016). A superexpressão desta enzima, devido a mecanismos regulatórios do *ERG11*, leva ao aumento da produção da molécula alvo e como consequência da menor efetividade do FCZ, à resistência (SANGLARD et al., 1998; PRASAD e RAWAL, 2014; COWEN et al., 2015). A superregulação de transportadores, ou bombas de efluxo, presentes na membrana celular constitui um importante mecanismo de resistência devido ao aumento da retirada dos fármacos do interior das células fúngicas e mantendo-as viáveis. São conhecidas duas classes de bombas importantes para o transporte de substâncias: as proteínas transmembranas do grupo *major facilitator superfamily* (MFS) e *ATP binding cassette transporter* (ABC). No entanto, apenas bombas do tipo ABC estão descritas em isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. resistentes ao FCZ. O transportador CnAFR1, codificado pelo gene *AFR1*, quando superexpresso causa o aumento do MIC de FCZ em células de *C. neoformans*, devido a expulsão do fármaco do interior das células, enquanto que linhagens

mutantes com este gene inativado resultam em melhor resposta à terapia com FCZ em modelo murino (POSTERARO et al., 2003; SANGUINETTI et al., 2006; CHANG et al., 2018). O aumento destas bombas pode ser avaliado por expressão gênica e também pelo acúmulo de substratos fluorescentes específicos para estes transportadores, como a rodamina 6G para CnAFR1 e CnMDR1 em células de *C. neoformans* (THORNEWELL et al., 1997; POSTERARO et al., 2003; CANNON et al., 2016).

A heterorresistência é outro mecanismo relacionado com a resistência e consiste na habilidade de uma subpopulação de células sobreviver a concentrações altas de azóis, gerando populações de células homogêneas com MIC elevado e capazes de se adaptar à concentrações ainda maiores de fármacos (MONDON et al., 1999; SIONOV et al., 2009; FERREIRA et al., 2015). A ocorrência de isolados com elevado MIC durante a terapia e recidivas da criptococose podem ser atribuídas à heterorresistência, sobretudo devido à exposição ao FCZ durante a fase de manutenção da terapia e possuem potencial de ocasionar a falha terapêutica (MONDON et al., 1999; YAMAZUMI et al., 2003; CHEONG e MCCORMACK, 2013; FERREIRA e SANTOS, 2017). Deste modo, esta seleção de células resistentes resultam da exposição prévia aos azóis e está associada, de modo geral, ao aumento da expressão dos genes *ERG11* e *AFR1*, ambos presentes no cromossomo 1 de *C. neoformans* (SIONOV et al., 2010, 2012).

Em relação a 5FC, são descritos apenas casos de resistência adquirida que ocorrem devido às alterações no complexo enzimático responsável pela captação e conversão do fármaco no interior da célula fúngica. Estas alterações podem levar à diminuição destas enzimas e consequentemente, à ausência da conversão no metabólico responsável pela atividade antifúngica; ou devido ao aumento de pirimidinas, que competem com os metabólicos e assim, diminuem sua ação (VERMES, 2000; PEMÁN et al., 2009).

Diferenças de suscetibilidade *in vitro* aos antifúngicos, entre *C. neoformans* e *C. gattii*, bem como aos tipos moleculares, tem sido relatadas (GOMEZ-LOPEZ et al., 2008; TRILLES et al., 2012), e aparentemente, a resposta ao tratamento de infecções causadas por *C. gattii* podem necessitar de terapia mais prolongada e intervenção cirúrgica (BYRNES et al., 2011). Além disso, resistência *in vitro* de *C. gattii* aos azólicos, particularmente entre algumas cepas altamente virulentas do tipo VGII responsável pelo surto no noroeste do Pacífico foi notada (HAGEN et al., 2010; IQBAL et al., 2010). Por este motivo, embora haja dados inconsistentes, acredita-se que possam existir diferenças de suscetibilidade neste tipo molecular de *C. gattii* (CHENG et al., 2009).

1.4.1 Suscetibilidade *In Vitro* de Antifúngicos

Os métodos para investigação *in vitro* dos fenótipos de resistência são fundamentados em método de referência, desenvolvidos pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) e tem como base a reação de inibição de crescimento do agente etiológico em meio líquido contendo antifúngicos, denominada microdiluição em caldo (CLSI, 2008).

O comitê europeu *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) propôs modificações nesse método, no intuito de tornar mais objetiva e reprodutível a leitura do ensaio e diminuir o tempo para emissão de resultados (ARENDRUP et al., 2015). O teste de suscetibilidade de referência demonstrou que valores de MIC elevados, frente a cepas de *C. neoformans* foram preditivos de falha clínica para os azólicos e, em menor grau para o AMB (JOSEPH-HORNE et al., 1995; PERFECT; COX, 1999).

Ambos os métodos têm acurácia para avaliar fenótipos de resistência ao FCZ em cepas do gênero *Candida* e *Cryptococcus*, entretanto, é consenso que para AMB outras técnicas devem ser empregadas para melhorar o desempenho do método (PARK et al., 2006).

Testes comerciais, desenvolvidos com base nos métodos de referência para determinação de MIC, são práticos e rápidos. Dentre os testes mais utilizados estão os realizados com fitas impregnadas de fármacos, por exemplo, o Etest®. Nesta técnica, o inóculo fúngico é semeado em placas de Petri com meio de cultura sólido e a fita, embebida com o antifúngico em concentrações crescentes, é adicionada. Após a incubação é possível observar a formação de uma elipse de inibição de crescimento fúngico na placa. O MIC é considerado quando é possível distinguir o fim desta inibição e o início do desenvolvimento do agente, na área próxima à fita (ESPINEL-INGROFF, 1994; ERNST, 2005). Este método tem a vantagem de identificar isolados resistentes à AMB, com maior precisão do que os métodos de diluição (LOZANO-CHIU et al., 1998; PFALLER et al., 1998; VANDENBOSSCHE et al., 2002).

1.4.2 Ação Fungicida de AMB por Metodologia de Curvas de Morte

Este método é indicado por oferecer dados mais fidedignos para demonstrar atividade fungicida da AMB. Já foi empregada para amostras de *Candida* spp. e *C. neoformans*, *C. gattii* e *Trichosporon* spp. e expressa a porcentagem de microrganismos mortos em função da ação de uma concentração fixa do antifúngico, em condições pré-estabelecidas. Trata-se, portanto, de um teste para avaliar a eficácia fungicida e que fornece a informação da dinâmica da ação do antifúngico sobre o agente (KLEPSEK et al., 1998, 1998; RODERO et al., 2000a; PAPPALARDO et al., 2009; CÓRDOBA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017).

1.4.3 Heterorresistência ao Fluconazol

Fungos do gênero *Cryptococcus* possuem alto potencial em desenvolver resistência *in vitro* ao FCZ, o que poderia explicar as constantes falhas terapêuticas e recidivas nos pacientes acometidos por essa doença e sob tratamento (SAR, 2004; SANGUINETTI et al., 2006). Algumas cepas são capazes de crescer em concentração maior do que aquela definida pelo MIC. Essa capacidade é mensurada em nível de heterorresistência ao FCZ (NHF). As cepas apresentam de 0,3% a 10% de subpopulações altamente resistentes sendo que algumas cepas de *C. neoformans* com alto NHF suportam concentrações de FCZ cinco vezes maiores do que o MIC. (MONDON et al., 1999; SIONOV et al., 2009; FELICIANO et al., 2017).

Heterorresistência de *C. neoformans* envolve aneuploidias cromossômicas e, portanto, o número de cópias de genes de resistência, incluindo *ERG11*, fica aumentado. Este mecanismo pode resultar em elevada transcrição do *ERG11* com maior produção de 14- α -demetilase resultando em escape da ação do fármaco (SIONOV et al., 2009b, 2010b; VARMA e KWON-CHUNG, 2010). O cromossomo 1, que alberga os genes *ERG11* e *AFR1* que codificam, respectivamente, a enzima alvo dos azóis e a proteína transportadora ABC, é o primeiro a se duplicar quando a cepa é exposta ao FCZ em concentrações acima do valor do MIC. À medida que a concentração do fármaco aumenta, observa-se também a duplicação do cromossomo 4, mostrando a alta plasticidade genômica dos agentes da criptococose (NGAMSKULRUNGROJ et al., 2012; SIONOV e CHANG; KWON-CHUNG, 2013). A

heterorresistência é um processo reversível, porém, muitas cepas necessitam de várias passagens em meio isento de FCZ para retornar ao perfil de suscetibilidade original, antes da exposição ao fármaco (VARMA e KWON-CHUNG, 2010). A estabilidade pode estar relacionada à sobrevivência da cepa explicando as constantes recidivas na criptococose e, além disso, está vinculada ao NHF (YAMAZUMI et al., 2003; SIONOV et al., 2009; VARMA e KWON-CHUNG, 2010; CHEONG e MCCORMACK, 2013; FERREIRA e SANTOS, 2017). Nesse sentido, estudos que avaliem a expressão de isolados clínicos com distintos níveis de NHF poderão contribuir para a elucidação dos mecanismos relacionados a esse fenômeno e fornecer subsídios para seu controle, bem como, contribuir para maior conhecimento da patogênese da criptococose.

1.5 JUSTIFICATIVA

Diversos casos clínicos de criptococose com falha terapêutica, evoluindo ao óbito e as frequentes recidivas descritas nesses pacientes desencadearam busca das causas desses eventos. A preocupação, entre clínicos, sobre surgimento de cepas do agente etiológico resistentes e tolerantes aos antifúngicos utilizados no combate a esta infecção é grande, tendo em vista as poucas opções de fármacos para criptococose (RODERO et al., 2003; CHEONG e MCCORMACK, 2013; SMITH et al., 2015; WHO, 2018). Por este motivo, é importante contribuir com dados de caracterização fenotípica e genotípica dos agentes etiológicos que permitam monitorar genótipos e resistência antifúngica para melhor manejo da infecção.

Além disso, as condições clínicas, em particular, aquelas relacionadas à imunossupressão são fatores marcadores da gravidade da neurocriptococose e definem a evolução da doença. Na criptococose a determinação de fatores prognósticos, sobretudo em relação à mortalidade hospitalar, ainda é falha e estudos que contribuíssem para diminuir tal lacuna são necessários (BRIZENDINE et al., 2013; JARVIS et al., 2014; BONGOMIN et al., 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar fenômenos de baixa suscetibilidade a antifúngicos e outros preditores clínicos que possam explicar falha terapêutica e recidiva da neurocriptococose

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Descrever genótipos e perfil de suscetibilidade aos antifúngicos de acordo com o MIC, NHF e tolerância à AMB, de isolados de *Cryptococcus* spp. provenientes de pacientes com neurocriptococose;
2. Identificar diferenças moleculares entre os isolados que estejam associadas ao perfil de suscetibilidade aos antifúngicos;
3. Identificar preditores da evolução clínica nestes pacientes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

A pesquisa adotou as recomendações da Resolução CNS nº196/1996 do Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisas (CONEP) e foi iniciada após a aprovação (Anexo), via Plataforma Brasil, pelo Comitê de Ética da Faculdade de Saúde Pública da USP (CAAE: 54949716.8.0000.5421), Comitê de Ética do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (CAAE: 54949716.8.2001.0061) e pelo Comitê de Ética em Pesquisas do Instituto Adolfo Lutz (CAAE: 54949716.8.3001.0059).

Todos os membros do grupo de pesquisa afirmaram conhecer as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos e assinaram a Declaração de Confidencialidade e Utilização de Informações (Anexo).

3.2 DESENHO DE ESTUDO

A pesquisa avaliou uma coorte de pacientes com coleta retrospectiva de informações. Foram analisados casos de criptococose de sistema nervoso central, internados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas de São Paulo (IIER). Consistiu em coleta sistemática de dados clínicos e caracterização dos isolados obtidos das amostras biológicas.

3.3 PERFIL DO HOSPITAL

O IIER é um hospital público terciário e referência para o tratamento de doenças infecciosas no estado de São Paulo e América Latina. Foi pioneiro no tratamento da aids no Brasil e atualmente grande parte dos pacientes atendidos são portadores de HIV/aids. Apresenta atualmente a capacidade operacional de 199 leitos, divididos em 4 enfermarias para

adultos, uma enfermaria infantil, uma unidade de terapia intensiva (UTI), hospital dia adulto/infantil e pronto socorro.

3.4 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Foram estudados 96 episódios iniciais de criptococose de sistema nervoso central de pacientes hospitalizados no IIER nos períodos de: agosto de 2012 a dezembro de 2013 e de janeiro de 2015 a agosto de 2017. Os 28 episódios de criptococose referentes ao período de 2012 e 2013 foram utilizados nesta pesquisa por apresentarem dados parcialmente coletados em estudo anterior (CHAGAS, 2014; OLIVEIRA, 2015).

Nesses estudos foi realizada a coleta parcial dos dados clínicos previstos para esta pesquisa, determinação dos genótipos, do MIC de FCZ e AMB e da atividade fungicida de AMB. Para o presente estudo foi realizada a complementação dos dados clínicos e a determinação do MIC de AMB e NHF e os testes moleculares.

Para os pacientes hospitalizados no período de janeiro de 2015 a agosto de 2017, todos os dados clínicos e epidemiológicos foram coletados para este estudo, além da identificação e caracterização dos isolados de acordo com o perfil de suscetibilidade e os testes moleculares.

3.5 COLETA DE DADOS E INFORMAÇÕES CLÍNICAS

Foram compilados dados médicos de prontuários físicos armazenados no Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) e de prontuários eletrônicos utilizando o Sistema de Informação Hospitalar S4SP. Os resultados dos exames laboratoriais, quando não estavam disponíveis nestes arquivos, foram obtidos do Sistema de Informação Hospitalar (SIGH).

Foram anotados os dados de gênero, idade, período de internação, sinais e sintomas da criptococose, forma clínica, terapia antifúngica, informações referentes à infecção por HIV, carga viral, valores de CD4 e CD8 e ocorrência de outras doenças infecciosas ou comorbidades. Os resultados de exames laboratoriais de líquido cefalorraquidiano (LCR) registrados foram: pressão de abertura durante a punção lombar nas coletas de LCR,

ocorrência de hipertensão intracraniana (quando pressão de abertura > 20 cmH₂O), pesquisa de antígeno de *Cryptococcus* spp., cultura, exame de Tinta da China, contagem de leveduras, dosagem de glicose e proteínas e contagem global e diferencial de células. Também foram coletados os resultados de dosagem de ureia e creatinina no sangue. Todos estes resultados foram referentes ao 1º dia de internação (1D), 7º (7D), 14º (14D), e 21º dia de internação (21D). Para a coleta destas informações foi utilizada uma ficha de coleta de dados para cada paciente (Apêndice 1).

3.6 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Os critérios de inclusão dos casos foram:

- i) Envio do isolado fúngico para diagnóstico de rotina ao Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz em São Paulo (IAL);
- ii) Diagnóstico de criptococose por exame direto de LCR pelo método de Tinta da China devido à presença de leveduras capsuladas e/ou pelo teste de aglutinação em látex, com a detecção de antígeno polissacarídeo de *Cryptococcus* spp. e;
- iii) Pacientes sem tratamento prévio para criptococose.

3.7 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos os casos de criptococose recidivantes do período do estudo, ou seja, aqueles já haviam realizado tratamento prévio para a doença devido infecção anterior. Pacientes cuja amostra clínica ou o isolado fúngico não foram enviados para diagnóstico ao IAL não foram utilizados no estudo.

3.8 ISOLADOS DE CRYPTOCOCCUS SPP.

Os isolados provenientes dos casos de criptococose foram identificados no Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz. Os testes incluíram microscopia ótica pela técnica de Tinta da China, para observação das características do gênero *Cryptococcus*, como formato e presença de cápsula mucopolissacarídica; testes de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, produção de urease e crescimento a 37°C. As colônias de *C. neoformans* foram submetidas ao crescimento em meio ágar canavanina, glicina e azul de bromotimol (CGB) para diferenciação entre *C. neoformans* e *C. gattii* (KURTZMAN et al., 2011).

Após a identificação presuntiva de espécie, os isolados foram submetidos à confirmação da espécie e identificação de genótipo por métodos moleculares e determinação de suscetibilidade aos antifúngicos. Os isolados foram, então, mantidos em meio crioprotetor à base de 10% leite desnatado glutamina e 5% de glutamato de sódio e armazenados a temperatura de -20°C, na Micoteca do Núcleo de Micologia do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

Para a realização dos experimentos do estudo, os isolados foram descongelados e semeados em ágar cromogênico ChromAgar Candida® para confirmação de pureza e analisados pela técnica de Tinta da China, para confirmação das características morfológicas. Após esta confirmação, os isolados foram mantidos em ágar Sabouraud com cloranfenicol durante a realização dos experimentos.

Em todos os experimentos foram utilizadas as cepas de referência *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265 (PERFECT et al., 1980; FRASER et al., 2005).

3.8.1 Extração de DNA Genômico

Este procedimento foi realizado para dois experimentos: determinação dos genótipos por RFLP-PCR e expressão gênica por quantificação relativa de DNA por PCR em Tempo Real de isolados selecionados com base na heterorresistência ao FCZ. Os experimentos foram desenvolvidos em momentos distintos, em três serviços: Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz, Laboratório de Interações Microbianas da Universidade Federal de São Paulo

(UNIFESP) e no Serviço de Micologia do Instituto de Salud Carlos III em Majadahonda, Espanha.

Os isolados foram semeados em meio ágar Sabouraud por 24h a 48 h e, então, submetidos à extração de DNA genômico conforme descrito por PERFECT et al. (1989), POLACHEK e LEBENS (1989) e SAMBROOK e RUSSELL, (2006).

Este procedimento englobou três etapas: lise e fragilização da parede celular, lise celular seguida de extração do DNA e quantificação e avaliação da integridade do DNA extraído. Inicialmente, foi realizada a lise e fragilização da parede celular. Para isto as células fúngicas foram adicionadas a microtubos tipo Eppendorf com 1 mL de ácido etileno diamino tetracético (EDTA, Sigma) 50mM pH8,0 e centrifugadas por 10.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e, ao sedimento, foi adicionado novamente 1mL de EDTA 50 mM, pH 8,0. Este processo foi repetido até que o sobrenadante estivesse límpido. Em seguida, para a digestão da cápsula e da parede celular, as células do sedimento foram ressuspensas em 200µL de EDTA, contendo 2mg de enzima lítica obtida de *Trichoderma harzianum* (Sigma). Esta suspensão foi incubada a 37°C por 30 minutos, sob agitação constante, sendo submetidos à homogeneização, por 30 segundos em agitador vórtex, a cada 10 minutos de incubação. Após centrifugação o sobrenadante foi retirado e, ao sedimento com os protoplastos, foram adicionados 200µL de tampão de lise (0,01% Sarcosil, 110µg/ml Proteinase K; 0,5% SDS) para início da etapa de lise celular e extração de DNA. Este material foi, a seguir, incubado sob agitação a 50°C por 30 minutos e submetido à agitação em vórtex a cada 10 minutos. A suspensão foi centrifugada por 8 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante foi transferido para outro microtubo. Ao sobrenadante foram adicionados 400µL de solução de clorofórmio/isopropanol (24:1) para promover a precipitação das proteínas e, após centrifugação por 15 minutos, houve a formação de três fases visualmente distintas. A fase aquosa (parte superior) foi retirada para outro microtubo e, para promover a precipitação do DNA, foram adicionados a esta fase 300µL de isopropanol seguido de centrifugação por 8 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foram adicionados 400µL de etanol 70% para a lavagem e purificação do DNA. Após centrifugação, por 8 minutos a 10.000 rpm, o sobrenadante foi desprezado e o microtubo foi mantido aberto para secagem do sedimento constituído de DNA. Após a secagem, o material foi ressuspenso em 50µL de solução tampão TE (Tris HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) com RNase a 1 µg/µL e mantido a 37°C por 30 minutos.

Os extratos foram submetidos à quantificação e análise de pureza do DNA, em aparelho espectrofotômetro NanoDrop®1000 e analisadas, também, quanto à integridade por

meio de eletroforese e gel de agarose. Para isso, a solução de DNA de cada amostra foi misturada à uma solução de tampão de amostra à base de corantes apropriados. Esta solução tem a função de assegurar a densidade adequada do DNA e de permitir o monitoramento da corrida por meio da observação do corante. Esta mistura foi, então, aplicada em gel de agarose a 0,8%, tampão TBE (Tris base, ácido bórico e EDTA 0,5M pH 8,0; Sigma) e brometo de etídio. O gel foi submetido à sistema de eletroforese horizontal unidirecional com tampão TBE durante 50 minutos a 100V e 400mA. Os géis foram visualizados em transiluminador ultravioleta com longitude de onda de 302 nm e os perfis de banda foram analisados visualmente. Após confirmação visual da integridade, as amostras de extratos contendo DNA foram armazenadas à temperatura de -20°C.

3.8.2 Determinação dos Genótipos

A tipagem foi realizada por PCR-RFLP segundo método descrito por MEYER et al., (2003). Este experimento foi realizado no Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz.

Para a amplificação do DNA foi utilizada a solução pronta para uso Go Taq® Green Master Mix (Promega). Esta solução contém *Taq* DNA polimerase, dNTPs, MgCl₂ e solução-tampão em concentrações ideais para a amplificação do DNA, além de corantes que permitem monitorar o curso da eletroforese e, ainda, possui densidade suficiente para que o produto da PCR seja aplicado, diretamente, no gel de eletroforese. O fragmento *URA5* foi amplificado utilizando par de *primers* URA5: 5'-ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG-3'; Sj01: 5'-TTAAGACCTCTCTGAACACCGTACTC-3'. Para isto, foram adicionados aos microtubos 50 ng/uL de DNA, 50 ng/uL de cada par de *primers* e a solução Go Taq® Green Master Mix. A reação de PCR ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 4 segundos; 63°C por 1 minuto; 72°C por 2 minutos e extensão final de 10 minutos a 72°C. Os produtos da PCR foram submetidos à confirmação de amplificação por eletroforese em gel de agarose e observação de banda característica. Após confirmação das bandas, os produtos foram digeridos duplamente com as enzimas *Sal* 96I (10U/uL) e *Hha*I (20/uL) por 3 horas a 37°C. Este material foi submetido novamente à corrida eletroforética e os perfis de bandas dos isolados foram assinalados e comparados com os perfis obtidos de cepas de referência *C. neoformans*: VNI-WM 148, VNII-WM 626, VNIII-WM 628 e VNIV-

WM 629 e *C. gattii*: VG I-WM 179, GVII- WM 178, VGIII-WM 161 e VGIV-WM 779, cedidas gentilmente pela FIOCRUZ-RJ.

3.8.3 Determinação da Suscetibilidade ao FCZ

Todos os isolados foram avaliados para determinação da suscetibilidade ao FCZ pelo método de referência europeu, descrito no documento E. Def. 7.3.1 do subcomitê AFST-EUCAST (ARENDRUP et al., 2015). O teste foi realizado no Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz.

Para o preparo das placas, soluções de FCZ em concentrações de 0,25 a 128 mg/L foram preparadas em meio líquido Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640, Cultilab, Brasil), tamponado com ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS), pH 7,2 e acrescido de 2% de glicose. Volumes de 100 µL de cada concentração de FCZ foram dispensados nos poços das placas, da coluna 2 (maior concentração) até a coluna 11, que foram logo embaladas e mantidas em freezer -70°C até seu uso.

Para os testes, os isolados foram semeados em ágar Sabouraud por 24 horas, e suspensos em solução salina estéril na concentração de 1 a 5×10^6 leveduras/mL (escala 0,5 de Mcfarland). Este inóculo foi diluído em meio RPMI-1640 com MOPS e 2% de glicose para a concentração final de teste em 1 a 5×10^5 leveduras/ mL.

Para a realização do teste, 100 µL de inóculo foram adicionados, em uma linha de poços de uma placa de microtitulação com fundo plano, da coluna 2 até a coluna 12. Cada linha da placa permitiu testar um isolado e, deste modo, foi possível realizar até 8 ensaios por placa, com concentrações de 0,12 a 64 mg/L de FCZ. A coluna 1 foi utilizada como “branco” para a leitura do teste e controle de esterilidade do meio RPMI-1640. A coluna 12 foi utilizada para controle positivo de crescimento do isolado, sem FCZ. Em cada placa foram testados 6 isolados e as cepas-padrão *C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019, para controle interno de qualidade do ensaio (Figura 1). As placas foram incubadas à 30°C por 48 a 72 horas e, após este período, foi realizada a leitura e registro em papel da turbidez de cada poço, em espectrofotômetro sob filtro de 492 nm (Titertek Multiscan, Flow, Suécia). A determinação do MIC ocorreu pela detecção do poço com turbidez reduzida em 50% ou mais (ou IC50) em relação ao poço referente ao controle de crescimento. Verificou-se a concentração de antifúngico dispensada nesse poço e determinado o MIC. Para a interpretação

dos resultados de MIC foram utilizados pontos de corte (*breakpoints*) adotados em estudos prévios e que foram considerados relevantes sob ponto de vista clínico, a saber: sensível MIC < 8 mg/L e resistente MIC $\geq$ 16 mg/L (ALLER et al., 2000; PFALLER et al 2005; DANNAOUI et al., 2005).

Figura 1 – Foto de placa de microdiluição usada no teste de suscetibilidade ao fluconazol para determinação da concentração inibitória mínima (MIC). As colunas 2 a 11 contém as diferentes concentrações do fármaco (em mg/L). Coluna 1: branco (C-). Coluna 12: controle de crescimento (CC). Em cada linha é possível testar 1 isolado. Linha G: *Candida krusei* ATCC6258 e linha H: *C. parapsilosis* ATCC22019.

3.8.4 Determinação da Suscetibilidade à AMB

Para a determinação da suscetibilidade à AMB foi utilizado o sistema Etest® para todos os isolados. Este sistema é composto de fita impregnada com um gradiente de concentração do antifúngico para obtenção do MIC. Os testes foram realizados, segundo orientação do fabricante, no Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz.

Os isolados foram semeados em ágar Sabouraud por 24 horas, previamente, ao teste. O inóculo de cada isolado foi preparado em concentração de 1 a 5 x 10⁶ células/mL e então semeados em placas de Petri com ágar Mueller-Hinton acrescido de azul de metileno. Após a adição das fitas Etest® sobre a superfície do meio devidamente inoculado, as placas foram

incubadas a 30°C por 48 a 72 horas. A leitura do teste deu-se no ponto de intersecção do halo elíptico de inibição, formado por ação do antifúngico equivalente à menor concentração capaz de inibir o crescimento (Figura 2).

Para a interpretação dos resultados foram utilizados *breakpoints* não padronizados, mas considerados relevantes e adotados em estudos prévios para AMB: sensível MIC<1 mg/L e resistente MIC $\geq$ 2 mg/L. (ALLER et al., 2000; PFALLER et al., 2005; DANNAOUI et al., 2006). As cepas-padrão *Candida krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 foram usadas para controle de qualidade dos lotes de fitas.

Figura 2 – Foto de um teste de suscetibilidade por Etest® de *C. neoformans* frente à anfotericina B. A seta em preto mostra a intersecção do halo de inibição com a fita indicando a concentração inibitória mínima (MIC) de 0,25 mg/L.

3.8.5 Estudo da Atividade Fungicida de AMB

3.8.6 Testes de Curvas de Morte por AMB

Todos os isolados foram analisados pela metodologia de Curvas de Morte para avaliação da atividade fungicida da AMB, segundo descrito por KLEPSER et al., (1998); RODERO et al., (2000) e PAPPALARDO et al., (2009). Todos os testes foram realizados em duplicata no Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz.

Para os testes, os isolados foram semeados em tubos com ágar Sabouraud e incubados a 30°C por 24 a 48 horas. Em seguida, foram submetidos a crescimento em meio líquido RPMI-1640, tamponado com MOPS, pH 7,2 e com 2% de glicose. Os isolados foram mantidos por 18 h a 24h a 30°C em agitação constante. Após este período, foi preparado o inóculo de leveduras em concentração de 1 a 5 x 10⁵ células/mL em tubos com meio RPMI 1640. O fármaco AMB foi diluído a 100mg/L em ácido dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionados, aos tubos de inóculo, na concentração de 1mg/L. Nestes testes foram incluídas as cepas *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265 e, além disso, foram preparados tubos de controle positivo de crescimento com esses dois isolados, ou seja, tubos teste sem AMB.

Após o preparo dos tubos testes foi retirada uma alíquota de 500 µL da suspensão que foram, então, diluídos em 4,5 mL de solução salina estéril. Foram retirados 30µL desta suspensão e semeados em placas de Petri, contendo meio ágar batata para contagem das colônias de leveduras (UFC/mL). Este procedimento caracterizou o momento denominado Tempo 0 (T0), pois se refere ao tempo ainda, sem incubação das células com 1 mg/L de AMB. A seguir, as placas de ágar batata identificadas como T0 foram incubadas a 30°C por, aproximadamente, 72 horas. Em paralelo, os tubos testes foram incubados sob agitação de 150 rpm sob 30°C. Após 6h foi retirada e processada nova alíquota, como descrito para o T0 para contagem de UFC/mL, para o Tempo 6 (T6). Às 12h, 24h, 48h e 72h de incubação estes procedimentos foram repetidos e referenciados, respectivamente, como T12, T24, T48 e T72.

A contagem de colônias em todas as placas de ágar batata (T6, T12, T24, T48 e T72) foi realizada após 72h de incubação com a finalidade de observar em que tempo de exposição as colônias foram inibidas de modo significativo (99,9%) pela AMB, em relação à contagem obtida na placa T0 (Figura 3). O tempo necessário para tal redução foi denominado *Time Kill* (TK). A contagem de colônias foi utilizada para a plotagem de gráfico capaz de ilustrar a curva de morte de cada isolado de acordo com o tempo de incubação com AMB.

Os isolados que apresentaram crescimento nas placas de ágar batata T24, T48 e/ou T72 foram classificados como tolerantes à AMB e denominados tAMB. Uma colônia de cada um desses isolados foi submetida à determinação do MIC de AMB por Etest® para verificar alteração do valor desse parâmetro após passagem pelo teste de Curvas de Morte.

Figura 3 – Foto da leitura do teste para determinação da atividade fungicida pelo teste de Curvas de morte com 1mg/L de anfotericina B. O número grifado indica que o tempo de morte necessário (*Time Kill- TK*) para este isolado de *C. neoformans* foi de 48 horas (TK48).

3.8.7 Investigação do Fenômeno de Tolerância à AMB

O isolados que derivaram tAMB foram utilizados para investigação do mecanismo de tolerância por capacidade de crescimento sob estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) segundo método usado por UPADHYA et al. (2013) e MARTHO et al. (2016).

Foram selecionados 29 isolados, de acordo com os resultados obtidos pelo teste de Curva de Morte com AMB, para serem submetidos aos testes de resistência ao stress oxidativo com H_2O_2 . Dentre estes isolados, 7 apresentaram tempo de morte (TK) em até 24 h de contato com 1mg/L de AMB e 22 apresentaram TK após 24h ou o crescimento de colônias após leitura do *endpoint*. Estes ultimos foram identificados como tolerantes.

Para este teste foram semeados spots de 5 μ L com concentrações de 10^6 a 10^2 células/mL, em placas com meio de cultura ágar YPD (controle positivo de crescimento) e placas com ágar YPD acrescido de 2,5 mM e 5mM de H_2O_2 . As placas foram incubadas a 30°C e analisadas diariamente quanto ao crescimento de colônias por até 72horas. Os testes foram realizados em duplicata e em cada placa foram semeadas as cepas *C. neoformans* H99 (TK24h) e uma cepa de *Candida guilliermondii* resistente a AMB (MIC AMB >1mg/L). A análise diferencial entre os isolados clínicos e a cepa H99 teve como base comparar a capacidade de crescimento destes isolados sob ação de H_2O_2 uma vez que um dos mecanismos de ação da AMB é a indução de estresse oxidativo. Esses experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Interações Microbianas da UNIFESP Campus Diadema sob supervisão da Dra. Renata Pascon e Dr. Marcelo Vallim.

Em 3 isolados e suas subpopulações tAMB, selecionados aleatoriamente, foram aplicados procedimentos para a caracterização do fenômeno de tolerância ao fármaco por metodologia de Curvas de Crescimento. Tais testes foram realizados com os isolados

originais em paralelo a seus derivados tAMB sobreviventes nos testes de Curvas de Morte. Para isto foi utilizada uma placa de microdiluição em caldo usada em teste de suscetibilidade a AMB de nas concentrações de 0,03 a 16 mg/L e foram selecionados 2 isolados de clínicos e a cepa *C. neoformans* H99 com os respectivos pares (original e tAMB). A placa foi mantida sob agitação de 150rpm/min a 30°C, em espectrofotômetro sob filtro de 492 nm (iEMS Reader, E.UA.). A cada hora o equipamento forneceu dados de turbidez usados para elaboração de gráficos (tempo/concentração) de modo à comparação das curvas de crescimento de cada par de isolados. Esses experimentos foram desenvolvidos no Serviço de Micologia do Instituto de Salud Carlos III em Majadahonda, Espanha sob supervisão do Dr. Oscar Zaragoza.

3.8.8 Determinação do NHF

A determinação do NHF foi realizada, para todos os isolados, de acordo com o método descrito por SIONOV et al., (2009). Todos os testes foram realizados em duplicata no Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz.

Para os testes, os isolados foram semeados em tubos com ágar Sabouraud e incubados por 24h. O inóculo de cada isolado foi preparado em concentração de $1,5$ a $2,5 \times 10^6$ leveduras/mL e, a partir desta suspensão, foram preparadas três concentrações por diluições seriadas (10^5 , 10^4 e 10^3 leveduras/mL). Todos estes inóculos foram semeados, por meio de *spot test*, em placas de Petri contendo ágar YPD contendo 7 concentrações de FCZ (0, 8, 16, 32, 64, 128 e 256mg/L). As placas inoculadas foram, então, incubadas a 30° C por até 72h. A determinação do NHF de cada isolado ocorreu pela observação de crescimento, de ao menos uma colônia, na placa com a maior concentração FCZ (Figura 4). Estas colônias foram retiradas e semeadas em novas placas contendo ágar YPD com concentração de FCZ equivalente ao do nível encontrado no procedimento anterior. As placas foram incubadas a 30°C por até 48h, para manutenção das células das subpopulações heterorresistentes, denominadas como hFCZ. Em paralelo, os isolados originais, dos quais derivaram as respectivas subpopulações hFCZ, foram semeados em placas com ágar YPD e incubadas por igual período.

Os isolados foram classificados como altamente heterorresistentes quando NHF foi ≥ 32 mg/L (SIONOV et al., 2009).

Figura 4 - Foto do teste para determinação do nível de heterorresistência ao fluconazol com a cepa *C. neoformans* H99. A maior concentração de FCZ capaz de permitir o crescimento (32mg/L de FCZ) está grifada.

3.8.9 Investigação do Fenômeno de Heterorresistência ao FCZ

Foi realizada seleção de 7 isolados para compor grupos, de acordo com o NHF, para investigação dos mecanismos de heterorresistência ao FCZ. O estudo para detecção de aneuploidia dos cromossomos 1 e 4, por quantificação de DNA por PCR em Tempo Real, foi realizado com cada subpopulação heterorresistente (hFCZ) em comparação à cepa que lhe deu origem (seu par do isolado original). Para tanto, foram selecionados 6 isolados clínicos de *C. neoformans* do genótipo VNI e a cepa *C. neoformans* H99 para extração de DNA e sequenciamento de regiões específicas do DNA. Os *primers* foram desenhados seguindo a mesma região utilizada por SIONOV et al., 2010 (Quadro 2).

Quadro 2- Pares de *primers* usados para a reação de PCR e sequenciamento de DNA dos isolados de *C. neoformans* VNI para estudo de mecanismos de heterorresistência ao fluconazol por aneuploidia cromossômica

Gene	Cromossomo	Id.	<i>Primers</i> (5' → 3')
CNAG 00040	1	CR1A	GAGTTGCCCATCATGGACTC
			ATGGCTGGTAAGGAGATTCG
CNAG 00815	1	CR1B	ATGTGGGCCGATATCTTCTG
			GATGACGACGGAAGTGAAGG
CNAG 02959	3	CR3	TGGTTCCATAGCTTGCATCA
			GGGGATAGAGGCACCATCTT
CNAG 07830	4	CR4A	CGGGTCCAAATGTCTCAACT
			GGGAGCCAGGATGATGAATA
CNAG 05063	4	CR4B	ACCGCATCGAACACCGAGA
			CCCTACGCGGAAAACATCATTG

Para a amplificação do fragmento foi preparada solução com volume final de 50 µL composta por 50 ng de DNA, *Taq* DNA polimerase, dNTPs, MgCl₂, solução-tampão e um dos respectivos pares de *primers*. A reação de PCR foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial de 98°C por 30 segundos, 35 ciclos de 98°C por 10 segundos; 72°C por 30 segundos e extensão final de 7 minutos a 72°C. Os produtos da PCR foram submetidos à confirmação de amplificação por meio de eletroforese em gel de agarose e observação de banda característica. Após confirmação das bandas, o produto da PCR foi submetido tratamento com a enzima *illustra™ ExoProStar™* (GE Healthcare bio-Sciences Corp., EUA) para purificação, seguindo instruções do fabricante. O material foi então submetido a sequenciamento de Sanger utilizando “Big Dye terminator” com os mesmos primers separadamente.

As sequências foram analisadas pelo programa SeqMan® (DNASTAR, Inc., EUA) e alinhadas com a cepa *C. neoformans* H99 (disponível em <http://fungidb.org/fungidb/>) utilizando o servidor Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) para a busca de possíveis mutações.

Após a confirmação de ausência de mutações, a amostras de DNA foram purificadas com o Kit High Pure PCR Template Preparation (Roche Molecular Systems, Inc., EUA) e quantificadas em NanoDrop®1000.

Volume total de 10µL de reação foi preparada com a solução SensiMix™ II Probe Kit (Bioline, EUA), os pares de primers e sondas Taqman® com as mesmas sequencias utilizadas por SIONOV et al., 2010 (Quadro 3) e, inicialmente, apenas com o DNA da cepa H99 em 4 concentrações (1ng/µL, 100pg/µL, 10pg/µL e 1 g/µL) em triplicata. Os procedimentos foram realizados nas seguintes condições: 50°C por 2 minutos, 95 ° por 10

minutos, 40 ciclos de 95° por 15 segundos e 60°C por 1 minuto em equipamento LightCycler® 480 (Roche Molecular Systems, Inc., EUA). A curva de eficiência para cada par de primer pode ser observada em Apêndice 2.

Quadro 3 - Pares de *primers* e sondas Taqman® usados para a reação de PCR em Tempo Real dos isolados de *C. neoformans* VNI para estudo de mecanismos de heterorresistência ao fluconazol por aneuploidia cromossômica (SIONOV et al., 2010).

Gene	Cromossomo	Primers (5' → 3')	Sonda Taqman®
CNAG 00040	1	TGGCAAGACGCCAAAGTCT GGCGGCAAATCCCTTTTC	AACCCTGCCCCGATGGCACGA
CNAG 02959	3	GAAGATGGCGAGCCTGACA CACTTCGAGCCTTCTTCTTCATG	CACCCAGGAGGAGCTCGCCGA
CNAG 07830	4	CCTTCAACTTCGTCCAATAATTCC GCGCAAAGCCGACATAGAA	CTCGCGCCGAAGCATCTCGC

A análise foi realizada utilizando o método de quantificação relativa de DNA ($\Delta\Delta CT$) descrito por LIVAK e SCHMITTGEN (2001), utilizando o cromossomo 3 como controle para cada isolado (SIONOV et al., 2010). Após a confirmação da duplicação das regiões referentes aos cromossomos 1 e 4 na cepa H99, os mesmos procedimentos foram realizados com 2 dos isolados clínicos que foram sequenciadas. Esses experimentos foram realizados em duplicata, no Serviço de Micologia do Instituto Carlos III, Majadahonda, Espanha sob supervisão do Dr. Oscar Zaragoza.

Estes experimentos foram repetidos com sondas Taqman® e a cepa H99 e, após obtenção dos mesmos resultados, foram realizados novamente utilizando o intercalante de DNA EvaGreen® e os mesmos pares de primers utilizados anteriormente. Inicialmente, o experimento foi realizado apenas com a cepa H99 e os resultados das curvas de *Melting* podem ser observados em Apêndice 3. Após obtenção dos resultados esperados, os experimentos foram repetidos com os mesmos 2 isolados clínicos analisados com as sondas Taqman® e, posteriormente com outros isolados. Foram analisados no total 22 isolados clínicos de *C. neoformans* com os devidos pares hFCZ e a análise foi realizada, do mesmo modo, pelo método de quantificação relativa, utilizando o cromossomo 3 como controle para cada isolado (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001) e em triplicata. Destes, 10 isolados foram selecionados aleatoriamente para as réplicas biológicas. Foram desenvolvidos em equipamento StepOnePlus™ *Real-Time* PCR (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) no Laboratório de Interações Microbianas da UNIFESP Campus Diadema sob supervisão da Dra. Renata Pascon e Dr. Marcelo Vallim.

Fo realizada a determinação da expressão de bombas de efluxo, por meio do acúmulo do composto fluorescente rodamina 6G nas células, por citometria de fluxo (POSTERARO et

al., 2003). Para isto, 10 isolados e seus pares hFCZ além das cepas *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265 foram submetidos a crescimento em meio YPD em agitação constante (150rpm) a 30°C por 24 horas. Foi preparada uma suspensão de leveduras na concentração de 10^6 células/mL e adicionados 10 μ M de rodamina 6G em tubo de poliestireno com meio YPD. Esta suspensão foi incubada por 30 minutos sob agitação constante a 30° C. Amostras controles não marcadas com rodamina 6G também foram preparadas. Após 30 minutos, os tubos foram mantidos em gelo por 5 minutos com a finalidade de parar a reação e logo submetidas a lavagem em solução tampão PBS pH 7,0 resfriada a 4° C. Depois as suspensões fúngicas foram diluídas 40 vezes na solução PBS resfriada e submetidas a análise da expressão de rodamina 6G por citometria de fluxo no equipamento Fortessa X20 (Becton Dickinson, EUA). Os resultados foram analisados no software FlowJo® (Becton Dickinson, EUA) quanto a presença de fluorescência nas células fúngicas e este acúmulo foi avaliado pela mediana da intensidade de fluorescência (*Median Fluorescence Intensity*, MFI) presente nas células. A variação da expressão da função das bombas de efluxo foi calculada pela proporção entre a MFI da rodamina 6G nas células hFCZ e na subpopulação de células originais. Os experimentos foram realizados em duplicata e conduzidos no Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz sob supervisão da Dra. Paula Ordonhez Rigato.

3.9 ANÁLISE DOS DADOS

3.9.1 Caracterização dos isolados

Foi realizada análise descritiva da distribuição de MIC de FCZ e AMB, média geométrica (MG) e as concentrações capazes de inibir 50% e 90% do isolados (MIC₅₀ e MIC₉₀). Do mesmo modo, foi feita a descrição da atividade da atividade fungicida e determinação do tempo de morte pelo método de Curvas de Morte e do NHF para todos os isolados.

A análise univariável dos resultados dos testes de suscetibilidade aos antifúngicos e espécies/genótipos foi realizada pelo Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney e a correlação entre valores de MIC e NHF e entre MIC e tempo de atividade fungicida de AMB foram analisados pelo Teste de correlação de Spearman.

O experimento para detecção de aneuploidias cromossômicas e a expressão de bombas de efluxo relacionadas à heterorresistência foram analisados pelo Teste t de *Student* com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) para comparar, respectivamente, isolado original e sua subpopulação de clones hFCZ.

3.9.2 Fatores Associados ao Prognóstico

Foram realizadas duas análises para avaliar duas variáveis dependentes sendo elas o óbito hospitalar e um desfecho composto. O desfecho composto foi definido pela ocorrência de um dos eventos: óbito hospitalar, encaminhamento para UTI durante a internação ou recidiva da criptococose 6 meses após a alta hospitalar.

Foi realizada a análise univariável para a descrição comparativa das variáveis categóricas e quantitativas em relação aos desfechos. As variáveis categóricas foram avaliadas pelo Teste Exato de Fisher. Já para as variáveis quantitativas, primeiramente foi avaliado o padrão de distribuição das mesmas pelo teste de normalidade Kolmogorov–Smirnov. O teste demonstrou padrão de distribuição significativamente diferente da distribuição normal para a maioria das variáveis e consequentemente, a análise univariável foi realizada pelo Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Foram selecionadas as variáveis que apresentaram $p \leq 0,20$ e aquelas com importância clínica ou epidemiológica, definidas pelos resultados dos testes de suscetibilidade aos antifúngicos, período de internação e de tratamento antifúngico. Por conseguinte, as variáveis foram testadas para determinação da Odds *ratio* (OR) associadas aos desfechos e, aquelas que estiveram mais associadas e com menor nível de significância, foram selecionadas para a análise múltipla.

No entanto, para evitar colinearidade entre as variáveis quantitativas, foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson e entre aquelas correlacionadas, ou seja, com coeficiente de correlação de Pearson $>0,6$, foi escolhida a que apresentou maior associação com o desfecho.

Para a análise múltipla usando regressão logística, foram selecionadas apenas as variáveis que se referiram aos dados obtidos nos primeiros dias de internação, ou passíveis de estarem disponíveis neste período, além daqueles usados no diagnóstico da criptococose. Foram utilizadas as variáveis com diferença estatística significativa e aquelas que

modificaram a medida de associação OR em mais de 10% em relação ao desfecho, de forma significativa. Também foi levado em consideração as variáveis que aumentaram a precisão das estimações por meio do erro padrão, ou seja, variáveis que apresentam a diminuição do intervalo de confiança.

O Teste de Pearson e o Teste de Hosmer-Lemeshow foram utilizados para avaliar a bondade de ajuste dos modelos escolhidos na análise múltipla, ou seja, se as estimativas, fornecidas pelos valores preditos pelos modelos, estiveram próximas ou não dos valores observados. Com os valores preditos foram elaboradas curvas *receiver operating characteristic* (ROC) e foi calculada a acurácia dos modelos para um ponto de corte de 0,5 (probabilidade de 50%). Foi avaliado se as associações foram mantidas ao excluir as observações com valores extremos como *outliers* (valores superiores 3 a média do *leverage*) e observações influentes (com *delta-deviance* acima de 4) (HOFFMANN, 2016).

A Regressão de Cox foi utilizada com o objetivo de analisar se os preditores identificados no modelo logístico estiveram também associados com o tempo até o desfecho. Assim, foi calculado o *Hazard Ratio* (HR) como medida de associação.

Curvas de Kaplan-Meier foram obtidas para representar graficamente o tempo de sobrevida desde a data de internação até a ocorrência de um dos desfechos. Além disso, curvas de sobrevida ajustadas pelas variáveis também foram elaboradas. Para análise do óbito, os pacientes que não desenvolveram o desfecho foram censurados no dia da alta hospitalar. Na análise secundária, os pacientes que não apresentaram um dos eventos foram censurados 180 dias (6 meses) após a alta hospitalar.

3.10 PROGRAMAS UTILIZADOS

Os dados coletados dos prontuários dos pacientes e os resultados referentes a caracterização dos isolados foram utilizados na elaboração de banco de dados em planilha do programa Microsoft Office Excel® 2013. Estas informações foram, posteriormente, transferidas para as análises pelo programa estatístico Stata® (versão 11.0, Stata Corp. LP, College Station, TX, EUA).

Os resultados referentes ao estudo de quantificação de DNA, tolerância a AMB, expressão de bombas de efluxo e estresse oxidativo foram analisados pelo programa GraphPad Prism (versão 5.0, Graphpad Software, La Jolla Califórnia, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 PACIENTES

De acordo com as informações disponíveis, a maior parte dos pacientes (96,6%;86/89) eram moradores da região metropolitana de São Paulo. O grupo foi composto por indivíduos com idade entre 19 e 68 anos (mediana de 38 anos) sendo 77,1% (74/96) homens e 22,9% (22/96) mulheres.

O período de internação variou de 1 a 202 dias com mediana de 38 e intervalo interquartil (IIQ) de 23-54 dias. Encaminhamento para UTI ocorreu para 30% (27/90) dos pacientes, com período de permanência de 1 a 48 dias e mediana de 7 dias (IIQ 2-21 dias) nessa unidade. Óbito hospitalar ocorreu em 26,9% (25/93) dos pacientes e recidiva em até 6 meses foram relatadas em 17,2% (16/93).

De acordo com os prontuários disponíveis, os sintomas relatados na internação com maior frequência foram cefaleia, vômito e febre, ocorrendo em 85,6% (77/90), 46,7% (42/90) e 38,9% (35/90) dos pacientes, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1- Informações sobre sintomas relatados na hospitalização em 90 pacientes de neurocriptococose, internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)

Sintomas na internação	N (90)	%
Cefaleia	77	85,6
Vômito	42	46,7
Febre	35	38,9
Náusea	28	31,1
Tonturas	15	16,7
Convulsões	12	13,3
Confusão mental	19	21,1
Perda de peso	10	11,1
Anorexia	9	10
Sonolência	5	5,6
Outros sintomas		
-Fotofobia, torpor e astenia	12	13,3
-Déficit motor, rigidez de nuca, diarreia, tosse, turvação visual	12	13,3
-Perda de memória, diminuição da acuidade visual, rebaixamento do nível de consciência, dispneia, dor de garganta, disartria, parapesia, dislalia	8	8,9

A maioria dos pacientes (96,7%; 87/90) eram portadores do vírus de HIV, com carga viral durante a internação desde indetectável até 3.436.979 cópias/mL de sangue e média 242.555 cópias/mL (mediana 104.126 cópias/mL; intervalo interquartil 1.824-332.156 cópias/mL). Carga indetectável (abaixo de 50 cópias/mL) foi observada em 8 (8,9%) pacientes. Os valores de CD4 variaram de 2 a 722 células/mm³ de sangue com média de 70 células/mm³ (mediana 42 células/mm³; intervalo interquartil 16-78 células/mm³).

Uma ou mais comorbidades foram registradas na internação de 30% (27/90) dos pacientes. As mais frequentes foram: infecção por hepatite tipos A/B/C (11/90; 12,2%), sarcoma de Kaposi (7/90; 7,8%) e hipertensão arterial sistêmica (6/90; 6,7%). Uma ou mais infecções foram diagnosticadas durante a internação em 58,8% (53/90) pacientes, incluindo: candidíase oral/esofágica (22,1%), tuberculose pulmonar (16,7%), infecção por citomegalovírus (13,3%), pneumonia (12,2%), neurotoxoplasmose (10%), sífilis (8,9%), pneumocistose (7,8%), herpes (6,7%) e neurotuberculose (5,6%) (Tabela 2).

Tabela 2 - Principais comorbidades registradas durante a internação em 90 pacientes de neurocriptococose internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)

Dados clínicos registrados durante a internação	N (90) *	%
Comorbidades		
Hepatite A/B/C	11	12,2%
Sarcoma de Kaposi	7	7,8%
Hipertensão arterial sistêmica	6	6,7%
Diabetes mellitus	5	5,6%
Anemia	3	3,3%
Linfoma	3	3,3%
Infecções		
Candidíase oral/esofágica	20	22,2%
Tuberculose pulmonar	15	16,7%
Infecção por citomegalovírus	12	13,3%
Pneumonia	11	12,2%
Neurotoxoplasmose	9	10%
Sífilis	8	8,9%
Pneumocistose	7	7,8%
Herpes	6	6,7%
Neurotuberculose	5	5,6%

Exames de imagem de ressonância magnética foram realizados em 33 (36,7%) e tomografia computadorizada em 80 (88,9%) dos 90 pacientes avaliados (Tabela 3). Dentre os resultados dos exames de ressonância magnética, 8 não apresentaram alteração, sendo os mais descritos: pseudocisto, criptococoma e lesões múltiplas (4 ocorrências cada), edema cerebral,

atrofia cortical e dilatação ventricular (2 ocorrências cada). Dentre os exames de tomografia computadorizada, 42 exames não apresentaram alteração e, nos demais, as lesões mais frequentes foram: atrofia cortical (15 ocorrências), lesões hipoatenuantes e lesões múltiplas (7 ocorrências cada) e edema cortical e dilatação ventricular (4 ocorrências cada).

Tabela 3- Resultados de exames de imagem do sistema nervoso central de 90 pacientes com neurocriptococose, internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)

Exames e Resultados*		
Ressonância magnética	(n=33)	%
Sem alteração	8	24,2
Pseudocisto	4	12,2
Criptococoma	4	12,2
Lesões múltiplas	4	12,2
Edema Cerebral	2	6,1
Atrofia cortical	2	6,1
Dilatação ventricular	2	6,1
Microadenoma	1	3,0
Ventriculite	1	3,0
Sem descrição	4	12,1
Tomografia Computadorizada	(n=80)	
Sem alteração	42	52,5
Atrofia cortical	15	18,8
Lesões hipoatenuantes	7	8,8
Lesões múltiplas	7	8,8
Edema cortical	4	5
Dilatação ventricular	4	5
Calcificação	2	2,5
Criptococoma	1	1,2
Pseudocisto	1	1,3
Isquemia	1	1,3
Assimetria ventricular	1	1,3

*dados encontrados na revisão dos 90 prontuários médicos disponíveis

Na indisponibilidade de resultados referentes aos exames laboratoriais realizados no 1D, 7D, 14D, 21D e 28D, foram anotados aqueles realizados em dias próximos (± 1 dia). A partir do 21D, pacientes foram a óbito ou receberam alta hospitalar, diminuindo o número de amostras. Por isso, as informações coletadas a partir deste não foram utilizadas nas análises.

A pressão de abertura foi medida na coleta de LCR e de acordo com a disponibilidade do equipamento para medição. Os valores de pressão de abertura e ocorrência de hipertensão intracraniana estão apresentados na Tabela 4. No 1D esta medida foi realizada em 69 (76,7%) pacientes e o valor observado foi de 8 a 150 cmH₂O com média de 39,38 cmH₂O (mediana de 33 cmH₂O). No 7D, foi relatada pressão de abertura em 46 (51,1%) pacientes, com valores de

1 a 92 cmH₂O e média de 24,65 cmH₂O (mediana de 17,75 cmH₂O). No 14D observou-se em 35 (38,9%) pacientes valores entre 6,8 a 63 cmH₂O e média 23,55 cmH₂O (mediana de 19,03 cmH₂O). Hipertensão intracraniana (pressão de abertura >20 cmH₂O) foi observada em 54 (78,6%) pacientes no 1D, em 20 (43,8%) pacientes no 7D e em 16 (45,7%) pacientes no 14D.

Tabela 4 – Resultados de pressão de abertura de LCR e ocorrência de hipertensão intracraniana de pacientes com neurocriptococose internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)

Dia de internação	Pressão de abertura (cmH ₂ O)		Hipertensão intracraniana (pressão de abertura >20 cmH ₂ O)	
	Intervalo	Média	N	%
1º dia (n=69)	8-150	39,38	54	78,6
7º dia (n=46)	1-92	24,65	20	43,8
14º dia (n=35)	9,5-63	23,55	16	45,7

Em 15,6% (14/90) dos pacientes foi realizada derivação ventrículo-peritoneal, para quando punções lombares periódicas não foram suficientes para controle da pressão intracraniana.

O teste de aglutinação em látex para antígeno de *Cryptococcus* spp. foi realizado nas amostras de LCR de acordo com a disponibilidade do *kit* de diagnóstico. Para os exames do 1D de internação, 87,8% dos pacientes apresentaram *Cryptococcus* spp. no exame de tinta da China, 79,6% dos pacientes apresentaram antígeno positivo e 97,8% dos pacientes tiveram cultura positiva para *Cryptococcus* spp. No 7D foram registrados 50% de resultados com antígeno positivo, 84,6% com teste de tinta da China positivo, e 69,3% de cultura positiva. No 14D foram observados 43,8% de exames positivos para antígeno, 72,7% de exames positivos para tinta da China, e 26,2% de cultura positiva (Tabela 5).

Tabela 5 – Resultados do teste de aglutinação em látex, exame de tinta da China e cultura realizados em amostras de LCR de 90 pacientes com neurocriptococose internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)

Dia de Internação	Testes de aglutinação em látex positivos		Exames de Tinta da China positivos		Culturas positivas para <i>Cryptococcus</i> spp.	
	N/Total	%	N/Total	%	N/Total	%
1º dia	39/49	79,6	79/90	87,8	87/89	97,8
7º dia	6/12	50	66/78	84,6	52/75	69,3
14º dia	7/16	43,8	48/66	72,7	17/65	26,2

As contagens de células de *Cryptococcus* spp. no LCR no 1D apresentaram valores de 0 a 11.520 leveduras/mm³, no 7D valores de 0 a 2809 leveduras/mm³ e no 14D intervalo de 0 a 1536 leveduras/mm³ (Tabela 6).

Tabela 6 – Resultados do exame de contagem de células de leveduras no LCR realizados em 90 pacientes com neurocriptococose internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)

Dia de Internação	Contagem de células de <i>Cryptococcus</i> spp. (leveduras/mm ³)			
	Intervalo	Média	Mediana	IQ
1º dia (n=90)	0-11520	750	192	6-665
7º dia (n=78)	0-2809	211	13	1-102
14º dia (n=66)	0-1536	56	3	0-26

Culturas positivas para *Cryptococcus* a partir de amostras de sítios extraneurais foram observadas em 20 (22,5%) pacientes, incluindo: sangue (18; 90%), pele (3; 15%), linfonodos e pulmões (1; 5% cada).

Os resultados para glicose variaram de 1 a 185 mg/dL no 1D, 1 a 111 mg/dL no 7D e 1 a 159 mg/dL no 14D. No 1D as dosagens de proteínas variaram de 10 a 1697 mg/dL, no 7D foi de 8 a 356 mg/dL e no 14D foi de 8 a 261 mg/dL. A celularidade variou de 0 a 800 cél./mm³ no 1D, 0 a 525 cél./mm³ no 7D e 0 a 133 no 14D (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultados de dosagem de glicose, proteínas e celularidade total em LCR, realizadas em 90 pacientes com neurocriptococose internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)

Dia de internação	Glicose (mg/dL)		Proteínas (mg/dL)		Celularidade (cél. /mm ³)	
	Intervalo	Média	Intervalo	Média	Intervalo	Média
1º dia	1-185	40,89	10-1697	102,46	0-800	51,97
7º dia	1-111	41,59	8-356	92,95	0-525	52,24
14º dia	1-159	47,90	8-261	67,54	0-133	32,91

Os níveis de creatinina no 1D foram de 0,47mg/dL a 2,49mg/dL e os níveis de ureia foram de 0,24mg/dL a 154mg/dL. No 7D, os níveis de creatinina foram de 0,52mg/dL a 4,52mg/dL e de ureia foram de 6mg/dL a 248mg/dL. No 14D, os valores de creatinina foram de 0,68mg/dL a 8,8 mg/dL e de ureia foram de 10mg/dL a 206mg/dL (Tabela 8).

Tabela 8 – Resultados de dosagens de creatinina e ureia no sangue de 90 pacientes com neurocriptococose internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)

Dia de internação	Creatinina (mg/dL)		Ureia (mg/dL)	
	Intervalo	Média	Intervalo	Média
1º dia (n=83)	0,47-2,49	0,92	0,24-154	33,41
7º dia (n=72)	0,52-4,52	1,33	6-248	53,44
14º dia (n=64)	0,38-8,85	1,37	10-206	48

Dados referentes a tratamento da criptococose durante a fase de indução foram obtidos para a maioria dos pacientes. Terapia combinada de AMB e FCZ foi utilizada em 42,9% (42/89) dos pacientes, AMB e 5FC em 50,6% (45/89) dos pacientes e terapia única com AMB foi prescrita para 2 (2,3%) pacientes.

4.2 ISOLADOS DE CRYPTOCOCCUS SPP.

4.2.1 Genótipos e Perfil de Suscetibilidade aos Antifúngicos

Dos 96 isolados, foram identificados 93 *C. neoformans*, sendo 76 de genótipo VNI e 17 VNII e 3 isolados *C. gattii*, todos de genótipo VGII.

Os valores de MIC de AMB situaram-se entre 0,012 mg/mL a 0,64 mg/L, com MIC₅₀ de 0,19 mg/L, MIC₉₀ de 0,38mg/L, média geométrica de 0,18 mg/L e moda de 0,25mg/L. Não foi observada diferença no MIC entre as espécies (p=0,32).

Para os genótipos VNI, os valores de MIC foram de 0,047 mg/L a 0,64 mg/L, para genótipos VNII foram de 0,012 mg/L a 0,38 mg/L. Os valores de MIC foram significativamente diferentes (p=0,03) entre estes genótipos. Para VGII foram observados MIC de 0,064 mg/L a 0,25 mg/L (Tabela 9). Porcentagem cumulativa do MIC AMB de acordo com os genótipos estão na Figura 5. Não foram observados isolados resistentes (MIC>2mg/L) à AMB, de acordo com o critério adotado.

Tabela 9 - Valores de concentração inibitória mínima (MIC) de anfotericina B de acordo com os genótipos de *Cryptococcus* spp., isolados de LCR de pacientes com neurocriptococose e internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)

Genótipos (n=96)	MIC AMB (mg/L)				
	Intervalo	MIC50	MIC90	Moda	MG
VNI (n=76)	0,047-0,64	0,19	0,38	0,25	0,19
VN II (n=17)	0,012-0,38	0,12	0,25	0,125	0,14
VGII (n=3)	0,064-0,25	na	na	na	0,12

AMB, anfotericina B; MIC, *Minimum Inhibitory Concentration* (Concentração Inibitória Mínima); MIC50 e MIC90, MIC de 50% e 90% dos isolados respectivamente; MG, média geométrica; na, não se aplica

Figura 5 - Histograma da frequência acumulada em porcentagem de 96 isolados clínicos de *Cryptococcus* spp., de acordo com a concentração inibitória mínima (MIC) de anfotericina B, provenientes de LCR de pacientes com neurocriptococose e internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017). Cada cor representa um genótipo, conforme legenda.

O intervalo de MIC de FCZ foi de 0,12 mg/L a 64 mg/L, MIC50 de 4mg/L, MIC90 de 16mg/L, média geométrica de 3,5 mg/L e moda de 16mg/L e diferença estatística foi observada entre os isolados de *C. neoformans* e de *C. gattii* ($p=0,03$).

Para genótipos VNI, os valores de MIC variaram de 0,12 mg/L a 64 mg/L e para VNII o intervalo de MIC foi de 0,12 mg/L a 0,64 mg/L. Os valores de MIC entre estes genótipos foram estatisticamente diferentes ($p=0,04$). MIC dos genótipos VGII variaram de 8 mg/L a 64 mg/L (Tabela 10). Porcentagem cumulativa do MIC de FCZ de acordo com os genótipos estão na Figura 6. Segundo *breakpoint*, 27 isolados (28,1%) foram resistentes a FCZ

(MIC $\geq$ 16mg/L), dentre eles 31,6 % (24/76) genótipo VNI, 5,9% (1/17) genótipo VNII e 66,7% (2/3) genótipo VGII.

Tabela 10 - Valores de concentração inibitória mínima (MIC) de fluconazol, de acordo com os genótipos de *Cryptococcus* spp., isolados de LCR de pacientes com neurocriptococose internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017).

Genótipos (96)	MIC FCZ (mg/L)				
	Intervalo	MIC50	MIC90	Moda	MG
VNI (n=76)	0,12-64	8	16	16	3,78
VNII (n=17)	0,12-64	2	4	1	1,83
VGII (n=3)	8-64	na	na	na	25,4

AMB, anfotericina B; FCZ, fluconazol; MIC, *Minimum Inhibitory Concentration* (Concentração Inibitória Mínima); MIC50 e MIC90, MIC de 50% e 90% dos isolados respectivamente; MG, média geométrica; na, não se aplica

Figura 6 - Histograma da frequência acumulada em porcentagem de 96 isolados clínicos de *Cryptococcus* spp., de acordo com a concentração inibitória mínima (MIC) de fluconazol, provenientes de LCR de pacientes com neurocriptococose e internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017). Cada cor representa um genótipo, conforme legenda

4.2.2 Determinação da Tolerância a AMB por Curvas de Morte

Foi observada atividade fungicida 1mg/L de AMB em TK6 para 21,5% (20/93), em TK12 para 20,4% (19/93), em TK24 para 22,6% (21/93), em TK48 para 17,2% (16/93) e em TK72 para 10,8 % (10/93) de isolados de *C. neoformans*. Para isolados de *C. gattii*, TK24 foi encontrado para 66,7% (2/3) e TK48 para 33,3% (1/3) dos isolados. Não houve associação entre o tempo de morte e MIC (coeficiente de correlação de Spearman=0,10; $p=0,35$)

Dentre os genótipos VNI, 17 isolados apresentaram TK6, 14 apresentaram TK12 e 18 apresentaram TK24. Às 48horas 13 isolados apresentaram atividade fungicida (*endpoint*) (TK48) e 8 isolados apresentaram TK72. No entanto, 6 (6/76; 7,9%) não apresentaram atividade fungicida após 72 horas de incubação com AMB. Para os isolados VNII, foram observados 3 isolados com TK6, 5 isolados com TK12 e 3 isolados com TK24. TK48 foi observado em 3 isolados e TK72 nos 3 isolados restantes. Dentre os isolados VGII, 2 apresentaram atividade fungicida a partir de 24 horas (TK24) e um apresentou TK48 (Tabela 11). Porcentagem cumulativa do TK de acordo com os genótipos estão na Figura 7.

Tabela 11 – Tempo necessário para a atividade fungicida de 1mg/L de anfotericina B, por Curvas de Morte, de acordo com os genótipos de *Cryptococcus* spp., isolados de LCR de pacientes com neurocriptococose internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)

Genótipos ($n=6$)	Número de isolados com cada TK (% cumulativa)				
	TK6	TK12	TK24	TK48	TK72
VNI ($n=76$)	17 (22,4)	14 (40,8)	18 (64,5)	13 (81,6)	8 (92,1)
VNII ($n=17$)	3 (17,6)	5 (47,1)	3 (64,7)	3 (82,4)	3 (100)
VGII ($n=3$)	0	0	2 (66,7)	1 (100)	0

TK, *Time Kill* (Tempo de Morte)

Figura 7 - Histograma da frequência acumulada em porcentagem de 96 isolados clínicos de *Cryptococcus* spp., de acordo com o tempo de morte (TK) frente 1mg/L de anfotericina B, provenientes de amostras de LCR de pacientes com neurocriptococose e internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017). Cada cor representa um genótipo, conforme legenda

Para 13 (13,5%;13/96) isolados foi observado crescimento de colônias após determinação do *endpoint* (ação fungicida de 99,9% de células). Dentre eles, 10 isolados de genótipo VNI e 3 VNII (Figura 8). Algumas destas colônias foram submetidas a determinação do MIC de AMB por Etest®, no entanto, não apresentaram alteração em relação ao isolado original.

Figura 8 – Gráfico referente às curvas de morte de 13 isolados de *C. neoformans* que apresentaram crescimento após aparente ação fungicida de 1mg/L de anfotericina B. Em algum momento do teste, unidades formadoras de colônias (UFC/mL) são observadas em quantidade acima do *endpoint*, (eixo y), de acordo com o tempo de exposição ao antifúngico (eixo x). Linha preta: cepa H99 sem antifúngico (controle de crescimento=sem antifúngico), linhas coloridas= isolados clínicos

4.2.3 Estudo de estresse oxidativo em isolados tolerantes a AMB

Todos os isolados apresentaram crescimento nas placas com 2,5mM de H₂O₂ até 72 horas (Figura 9) e 79,3% apresentaram crescimento quando submetidos a incubação com 5mM de H₂O₂ (23/29).

Dentre os isolados que cresceram a 5mM de H₂O₂, a maioria (78,3%; 18/23) eram isolados considerados tolerantes a AMB. O total de 20,7% dos isolados (6/22) não cresceram a 5mM de H₂O₂, e apenas duas destas tem TK abaixo de 24 horas.

Figura 9 - Foto do experimento de estresse oxidativo com H₂O₂. A cepa *Candida guilliermondii* cresce em todas as concentrações de H₂O₂. *C. neoformans* H99 cresce apenas até 2,5mM de H₂O₂ e o mesmo ocorre com o primeiro isolado clínico. O segundo isolado apresenta crescimento a 5 mM de H₂O₂

Os 3 isolados e seus respectivos pares de subpopulações tAMB selecionados para perfil por curva de crescimento apresentaram comportamento significativamente diferente entre eles ($p < 0,05$), nas diferentes concentrações de AMB testadas (Figura 10). No entanto, o valor de MIC permaneceu o mesmo para ambos os isolados.

Figura 10 – Gráfico referente às curvas de crescimento para a cepa *C. neoformans* H99 e sua subpopulação tolerante a 1 mg/L de anfotericina B (AMB) em diferentes concentrações. Observa-se o crescimento do fungo (eixo y) pelo tempo de incubação (eixo x). CC: controle de crescimento (sem antifúngico)

4.2.4 Determinação do NHF

Os valores de NHF variaram de 16mg/L a 128mg/L. Dentre *C. neoformans* 90,3% (84/93) dos isolados apresentaram $\text{NHF} \geq 32\text{mg/L}$. Não houve associação entre NHF e MIC de FCZ (coeficiente de correlação de Spearman=0,19; $p=0,06$).

De acordo com os genótipos, $\text{NHF} \geq 32\text{mg/L}$ foi obtido para 93,4% (71/76) dos isolados VNI e para 76,5% (13/17) de VNII. Para *C. gattii*, os 3 isolados apresentaram $\text{NHF} \geq 64\text{mg/L}$ (Tabela 12).

Tabela 12 - Valores de nível de heterorresistência (NHF) ao fluconazol de acordo com os genótipos de *Cryptococcus* spp., isolados de LCR de pacientes com neurocriptococose internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)

Genótipos (96)	Número de isolados de acordo com o NHF (%)					
	8mg/L	16 mg/L	32 mg/L	64 mg/L	128 mg/L	256 mg/L
VNI ($n=76$)	0	5 (6,6)	42 (55,3)	27 (35,5)	2 (2,6)	0
VNII ($n=17$)	0	4 (23,5)	9 (52,9)	3 (17,7)	1 (5,9)	0
VGII ($n=3$)	0	0	0	1 (33,3)	2 (66,7)	0

NHF, nível de heterorresistência ao fluconazol

Os isolados que foram submetidos a quantificação de DNA foram observados por microscopia ótica pelo método de Tinta da China. As células hFCZ apresentaram morfologia

distinta em relação a população original, apresentando tamanho aparentemente maior além de muitas estarem em filimentação (Figura 11).

Figura 11 – Foto de microscopia ótica de células de *Cryptococcus neoformans*, provenientes da cepa H99 e de um isolado clínico, e de suas respectivas subpopulações heterorresistentes ao fluconazol (hFCZ). A= H99 população original, B e C= H99 hFCZ a 32mg/L, D= isolado clínico 61 população (original), E e F= isolado 61 hFCZ 32mg/L

4.2.5 Determinação de expressão de DNA de células hFCZ

Aumento da expressão de DNA por PCR em Tempo Real na região referente ao cromossomo 1 foi observada em 61,2% dos isolados analisados (15/22). Aumento da expressão para os cromossomos 1 e 4 foi observada em 27,3% das subpopulações hFCZ (6/22). Aumento da expressão apenas do cromossomo 4 não foi observado em nenhum isolado (Tabela 13).

Um dos pares *primer* referente ao cromossomo 1 foi excluído devido a formação de dímeros (Apêndice 3). Para o isolado identificado como N.40 não foi observada diferença na quantificação relativa entre a subpopulação hFCZ e o respectivo isolado original ($p > 0,05$).

Tabela 13 - Resultados da PCR em Tempo Real para quantificação de DNA e determinação de duplicação dos cromossomos 1 e 4 de 22 isolados clínicos de *C. neoformans*. A análise foi feita por meio da comparação das subpopulações heterorresistentes ao fluconazol com as respectivas células do isolado original.

Id.	Genótipo	Nível de heterorresistência ao fluconazol	Duplicação dos cromossomos na subpopulação hFCZ	
			Cromossomo 1	Cromossomo 4
H99	VNI	32	S	S
4	VNII	128	S	N
5	VNI	128	S	S
6	VNI	64	S	N
11	VNI	64	S	S
26	VNII	64	S	N
28	VNI	64	S	S
31	VNI	32	S	N
34	VNI	32	S	N
39	VNI	32	S	N
40	VNI	32	N	N
47	VNI	32	S	N
48	VNI	32	S	N
49	VNI	32	S	N
61	VNI	32	S	N
67	VNI	32	S	N
70	VNI	32	S	S
72	VNI	32	S	S
81	VNI	32	S	N
85	VNII	32	S	S
87	VNI	64	S	N
88	VNI	64	S	N
89	VNI	32	S	N

hFCZ, subpopulação de células heterorresistentes ao fluconazol; S, sim; N, não

4.2.6 Expressão de bombas de efluxo na vigência de heterorresistência ao FCZ por citometria de fluxo

O total de 11 isolados foi analisado quanto ao funcionamento das bombas de efluxo por acúmulo de rodamina 6G no interior das células fúngicas. A cepa *C. neoformans* H99 foi incluída em todos os testes e, para esta cepa foi observada diferença significativa ($p=0,001$) na expressão da rodamina 6G, sendo menor nas células da subpopulação hFCZ em relação às

células do seu isolado original. Isto indica maior atividade das bombas de efluxo e expulsão do composto fluorescente do meio intracelular nos isolados hFCZ (Figura 12). O mesmo pode ser observado para a cepa *C. gattii* R265 ($p=0,01$). As subpopulações hFCZ de H99 e R265 expressaram em média 0,54 e 0,62 menos rodamina em relação às correspondentes cepas originais, respectivamente.

Figura 12 - Expressão de rodamina 6G por citometria de fluxo da cepa *Cryptococcus neoformans* H99, para análise do funcionamento das bombas de efluxo de acordo com o acúmulo de fluorescência nas subpopulações de células heterorresistentes ao fluconazol (hFCZ) e na população original. A) Expressão de rodamina 6G (eixo x) por contagem de células marcadas (eixo y) da subpopulação hFCZ marcada com rodamina 6G, área azul; população original marcada com rodamina 6G, vermelho; e controles de células não marcadas, hFCZ, laranja e original, verde); B) Mediana da intensidade de fluorescência (MFI) em células marcadas (verde claro e escuro) e não marcadas (sf, controle, em rosa e laranja)

A média de MFI nas subpopulações hFCZ foi 4014 (mediana=2707; IIQ=2524,5-5212) enquanto que das populações originais foi 9655 (mediana=8392; IIQ=3070,5-14830,5). Os valores de proporção de MFI variaram 0,20 a 1,02 (Tabela 14) com média MFI de 0,56 e mediana de 0,52 entre os isolados clínicos. Além disso, a maioria das subpopulações de *C. neoformans* hFCZ expressaram menor intensidade de fluorescência em relação aos respectivos isolados originais, sendo que 8 subpopulações hFCZ apresentaram proporção $\leq 0,7$ em relação às populações de células originais. Diferença significativa ($p=0,01$) foi observada entre a expressão de fluorescência das subpopulações hFCZ em comparação aos seus pares originais (Figura 13).

Tabela 14 - Resultados do experimento de acúmulo de rodamina 6G para análise de expressão de bombas de efluxo em 11 isolados clínicos de *C. neoformans* e suas subpopulações de células heterorresistentes ao fluconazol.

Id.	Genótipo	Nível de heterorresistência ao fluconazol	Proporção da MFI entre subpopulação hFCZ e original
H99	VNI	32	0,54
R265	VGII	64	0,62
5	VNI	128	0,70
8	VNI	64	0,04
26	VNII	64	0,49
33	VNI	32	0,32
39	VNI	32	0,93
43	VNII	32	0,61
67	VNI	32	0,94
70	VNI	32	0,20
89	VNI	32	1,02
90	VNI	128	0,45
97	VNII	32	0,52

MIC, *Minimum Inhibitory Concentration* (Concentração Inibitória Mínima); MFI; mediana da intensidade de fluorescência (*Median Fluorescence Intensity*)

Figura 13 – Box plot da mediana da intensidade de fluorescência (MFI) de rodamina 6G de 11 isolados clínicos de *C. neoformans* (isolados originais) e suas respectivas subpopulações de células heterorresistentes ao fluconazol (hFCZ). Mediana e intervalo interquartil 25 e 75 são mostradas nas linhas centrais, inferiores e superiores das caixas, respectivamente. As barras representam os valores mínimo e máximo.

4.3 FATORES ASSOCIADOS AO PROGNÓSTICO

4.3.1 Análise univariável em relação à mortalidade hospitalar

Os resultados de genótipo, resistência a FCZ, tolerância à AMB e alto NHF não mostraram relação com o desfecho de óbito hospitalar (Tabela 15).

Tabela 15 - Análise univariável de genótipo, resistência a FCZ, tolerância à AMB e alto nível de heterorresistência ao FCZ, em relação ao óbito hospitalar, de pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)

Variável	Total N/Total (%)	Óbitos N/Total (%)	Sobreviventes N/Total (%)	<i>p</i>
Genótipo VNI	77/96 (80,2%)	18/25 (72%)	57/68 (83,8%)	0,24
Genótipo VNII	16/96 (16,7%)	6/25 (24%)	9/68 (13,2%)	0,22
Genótipo VGII	3/96 (3,1%)	1/25 (4%)	2/68 (2,9%)	1,00
Resistência a FCZ (MIC $\geq$ 16mg/L)	27/96 (28,1%)	7/25 (28%)	20/68 (29,4%)	1,00
Tolerância a 1mg/L de AMB (TK $\geq$ 24h)	57/96 (59,4%)	11/25 (44%)	44/68 (64,7%)	0,09
Alta heterorresistência (NHF $\geq$ 32mg/L)	87/96 (90,6%)	22/25 (88%)	62/68 (91,2%)	0,70

FCZ, fluconazol; AMB, anfotericina B; MIC, *Minimum Inhibitory Concentration* (Concentração Inibitória Mínima); TK, *Time Kill*

Os resultados da análise univariável das variáveis categóricas, em relação ao desfecho primário de óbito hospitalar e que apresentaram $p \leq 0,20$, são apresentados na Tabela 16. As variáveis que apresentaram diferença estatística significativa em relação ao óbito foram idade, escala de Coma de Glasgow, contagem de leveduras no LCR no 1D, contagem de eosinófilos no LCR no 7D, contagem de leveduras no LCR no 14D e dosagem de ureia no sangue no 14D. Os resultados da análise univariável de todas as variáveis categóricas com relação ao óbito pode ser observado no Apêndice 4.

Tabela 16 - Análise univariável das variáveis categóricas de prognóstico e que apresentaram $p \leq 0,20$, em relação ao óbito hospitalar, dos pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)

Variáveis	Total N/Total (%)	Óbitos N/Total (%)	Sobreviventes N/Total (%)	<i>p</i>
Náusea	28/90 (31,1%)	6/22 (27,3%)	22/68 (32,4%)	0,07
Convulsões	12/90 (13,3%)	6/22 (27,3%)	6/68 (8,8%)	0,06
Confusão mental	19/90 (21,1%)	8/22 (36,4%)	11/68 (16,2%)	0,07
Torporoso	4/90 (4,4%)	3/22 (13,64%)	1/68 (1,5%)	0,004
Hipertensão arterial sistêmica	6/90 (6,7%)	5/22 (22,7%)	1/68 (1,5%)	0,003
Cultura positiva para <i>Cryptococcus</i> spp. de outro sítio	20/89 (22,5%)	9/22 (40,9%)	11/67 (16,4%)	0,04
Cultura positiva para <i>Cryptococcus</i> spp. no sangue	18/89 (20,2%)	8/22 (36,4%)	10/67 (14,9%)	0,06
Cultura positiva para <i>Cryptococcus</i> spp. na pele	3/89 (3,4%)	2/22 (9,1%)	1/67 (1,5%)	0,15
Pneumonia	11/90 (12,2%)	6/22 (27,3%)	5/68 (7,3%)	0,02
Edema cerebral por TC	4/90 (4,4%)	3/22 (13,6%)	1/68 (1,5%)	0,04
Dilatação ventricular por TC	4/90 (4,4%)	3/22 (13,6%)	1/68 (1,5%)	0,04
Internação em UTI	27/90 (30%)	15/22 (68,2%)	12/68 (17,7%)	<0,001
Cultura positiva para <i>Cryptococcus</i> spp. no LCR no 7D	52/75 (69,3%)	14/16 (87,5%)	38/59 (64,4%)	0,12
Tinta da China positiva para <i>Cryptococcus</i> spp. no LCR no 14D	48/66 (72,7%)	9/9 (100%)	39/57 (68,4%)	0,10
Cultura positiva no LCR no 14D	17/65 (26,2%)	5/8 (62,5%)	12/57 (21,1%)	0,02

TC, tomografia computadorizada do crânio; LCR, líquido cefalorraquidiano; UTI, Unidade de Terapia Intensiva; 7D, 7º dia de internação; 14D, 14º dia de internação

Variáveis quantitativas que apresentaram $p \leq 0,20$ e as consideradas de importância clínica e epidemiológica (suscetibilidade aos antifúngicos, período de internação e de tratamento antifúngico) são apresentadas na Tabela 17. As variáveis de importância clínica e epidemiológica não apresentaram associação significativa com o óbito hospitalar. As variáveis que apresentaram diferença estatística foram: idade, escala de coma de Glasgow, contagem de eosinófilos no LCR no 7D, dosagem de ureia no sangue no 7D, contagem de leveduras no LCR no 14D e dosagem de ureia no sangue do 14D. Os resultados da análise univariável de todas as variáveis quantitativas com relação ao óbito pode ser observado no Apêndice 5

Tabela 17 - Análise univariável das variáveis quantitativas que apresentaram $p \leq 0,20$ e de importância clínica epidemiológica, em relação ao óbito hospitalar, dos pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)

Variáveis	Total Média (IIQ)	Óbitos Média (IIQ)	Sobreviventes Média (IIQ)	<i>p</i>
Idade (anos)	38,7(29-46)	44,2(36-52,5)	36,4(28-44,5)	0,007
Glasgow (escala de coma)	14,6(15-15)	13,9(14-15)	14,8(15-15)	<0,001
Contagem de leveduras no LCR no 1D (células/mm ³)	749,5(6-665)	1696,4(340-2240)	443,2(3-384)	<0,001
Pressão de abertura do LCR no 1D (cmH ₂ O)	39,3(22,4-50)	47,9(26,2-60,5)	36,79 (20,5-50)	0,20
Dosagem de ureia no sangue no 1D (mg/dL)	33,4(21-40)	42,9(22-48)	30,0(21-35)	0,057
MIC de AMB (mg/L)	0,23(0,12-0,25)	0,23(0,12-0,25)	0,23(0,12-0,25)	0,95
MIC de FCZ (mg/L)	9,4(1-16)	10,3(1-16)	9,28(1-16)	0,41
NHF (mg/L)	45,8(32-64)	45,4(32-64)	46,6(32-64)	0,92
TK 1mg/L de AMB (horas)	27,9(12-48)	24(6-24)	29,8(12-48)	0,17
Contagem de leveduras no LCR no 7D (células/mm ³)	211,1(1-102)	457,4(1-420)	142,4(1-59)	0,06
Dosagem de proteínas no LCR no 7D (mg/dL)	92,96(40-125)	117,4(44-156)	86,74(40-114)	0,17
Contagem de eosinófilos no LCR do 7D (%)	1,1(0-0,5)	0(0-0)	1,4(0-2)	0,01
Contagem de linfócitos no LCR do 7D (%)	77,1(78,5-1)	83,2(85-95)	75,4(78-90,5)	0,10
Dosagem de creatinina no sangue no 7D (mg/dL)	1,33(0,92-1,48)	1,63(0,97-2,24)	1,23(0,88-1,44)	0,17
Dosagem de ureia no sangue no 7D (mg/dL)	53,4(25,5-62,5)	84,9(57-104)	43,27 (54-68)	<0,001
Pressão de abertura do LCR no 14D (cmH ₂ O)	23,5(12,6-30)	33,0(28-43)	22,0(12,6-25,8)	0,10
Contagem de leveduras no LCR no 14D (células/mm ³)	56,2(0-26)	29,3(7-46)	60,5(0-16)	0,03
Contagem de neutrófilos no LCR no 14D (%)	4,0(0-1,5)	13,4(0-6)	2,2(0-1)	0,09
Dosagem de creatinina no sangue no 14D (mg/dL)	1,37(0,96-1,54)	2,05(1,07-2,12)	1,22(0,88-1,49)	0,07
Dosagem de ureia no sangue do 14D (mg/dL)	48(24-61)	88,9(47-134)	39,3(24-49)	<0,001
Tempo de internação (dias)	40,7(23-54)	38,2(10-57)	41,6(28,5-48,5)	0,15
Tempo de internação na UTI (dias)	12,59(2-21)	16,87(4-27)	7,25 (2-8)	0,20
Tempo terapia de indução (dias)	21,1(20-40)	27,3(6,5-44)	32,3(22-40)	0,14

IIQ, intervalo interquartil 25-75%; LCR, líquido cefalorraquidiano; MIC, *Minimum Inhibitory Concentration* (Concentração Inibitória Mínima); FCZ, fluconazol; AMB, anfotericina B, 1D, 1º dia de internação; 7D, 7º dia de internação; 14D, 14º dia de internação

Para algumas variáveis quantitativas, foram testadas também versões na escala logarítmica. No entanto, quando a variável possuía o valor 0 foi adicionado uma unidade a todas as observações, antes de transformar em logaritmo, evitando assim perdas relacionadas com o logaritmo natural de 0. Por exemplo, a variável referente a contagem de leveduras do

LCR no 1D foi testada também na escala de logaritmo natural e apresentou maior associação ao desfecho do que o valor bruto sendo identificada como contagem de leveduras no LCR do 1D-log. As variáveis que apresentaram associação com diferença estatística em relação ao óbito hospitalar foram: idade, escala de coma de Glasgow, contagem de leveduras no LCR do 1D-log, contagem de leveduras do LCR no 7D-log, contagem de eosinófilos no LCR no 7D, dosagem de ureia no sangue no 1D, 7D e 14D (Tabela 18).

Tabela 18 - Análise univariável das variáveis quantitativas associadas ao óbito hospitalar de pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)

Variáveis	Odds Ratio	Intervalo de Confiança 95%	p
Idade (anos)	1,06	1,02- 1,11	0,006
Glasgow (escala de coma)	0,59	0,35- 0,99	0,047
Contagem de leveduras no LCR no 1D-log	1,55	1,19- 2,02	0,001
Pressão de abertura do LCR do 1D (cmH ₂ O)	1,01	0,99- 1,04	0,14
Dosagem de ureia no sangue no 1D (mg/dL)	1,03	1,00- 1,06	0,03
MIC de AMB (mg/L)	1,14	0,05- 26,90	0,93
MIC de FCZ (mg/L)	1,00	0,97- 1,04	0,74
NHF (mg/L)	1,00	0,98- 1,02	0,84
TK AMB (horas)	0,99	0,96- 1,01	0,27
Contagem de leveduras no LCR no 7D-log	1,27	1,00- 1,60	0,04
Dosagem de proteínas do LCR do 7D (mg/dL)	1,00	0,99-1,01	0,14
Contagem de eosinófilos no LCR do 7D (%)	1,00	0,23- 0,75	0,004
Contagem de linfócitos no LCR do 7D (%)	1,01	0,98- 1,05	0,30
Dosagem de creatinina no sangue do 7D (mg/dL)	2,05	0,97-4,35	0,06
Dosagem de ureia no sangue do 7D (mg/dL)	1,02	1,00-1,04	0,005
Pressão de abertura do LCR no 14D (cmH ₂ O)	1,05	0,99- 1,04	0,10
Contagem de leveduras no LCR no 14D (log)	1,00	0,99- 1,00	0,69
Contagem de neutrófilos no LCR do 14D (%)	1,07	1,00-1,14	0,06
Dosagem de creatinina no sangue do 14D (mg/dL)	2,25	0,75-6,73	0,15
Dosagem de ureia no sangue do 14D (mg/dL)	1,05	1,02- 1,09	0,002
Tempo de internação (em dias)	0,99	0,98- 1,01	0,59
Tempo de internação na UTI (dias)	1,06	0,98-1,15	0,11
Tempo terapia de indução (em dias)	0,98	0,96- 1,01	0,30

log, escala logarítmica; LCR, líquido cefalorraquidiano; AMB, anfotericina B; FCZ, fluconazol; 1D, 1º dia de internação; 7D, 7º dia de internação; 14D, 14º dia de internação.

As variáveis quantitativas que apresentaram associação com *p* menor do que 0,20 foram submetidas a teste de correlação de Pearson (Apêndice 6) e as variáveis de escala de Glasgow, contagem de leveduras do 14D, dosagem de ureia do 7D e dosagem de creatinina do 14D foram excluídas das análises subsequentes para evitar colinearidade.

As variáveis quantitativas foram analisadas ainda quanto à evolução da Odds ser compatível com uma relação linear. Para isto, as variáveis referentes aos dados do 1D foram

categorizadas em decis e então avaliadas em relação ao óbito hospitalar (Figura 14). Assim, foi analisada a possibilidade de definir pontos de corte, por meio da determinação da Odds de cada decil, e categorizar as variáveis.

Figura 14 - Gráficos das variáveis quantitativas associadas ao óbito hospitalar determinadas no 1º dia de internação para análise da evolução da Odds. A) Idade, B) Contagem de leveduras 1D, C) Pressão de abertura no 1D e D) Dosagem de ureia no sangue no 1D

Apenas a variável ureia do 1D de internação foi transformada em variável categórica pois a partir de 40 mg/dL (decil 9) foi observada a estabilização da OR (Figura 14D). Portanto, essa variável foi definida em valores menores e iguais que 40mg/dL e valores maiores a este. As demais variáveis foram mantidas como quantitativas em sua forma original.

Os resultados das medidas de associação entre as variáveis categóricas e o óbito hospitalar são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 - Análise univariável das variáveis categóricas associadas ao óbito hospitalar de 96 pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)

Variáveis	Odds Ratio	Intervalo de Confiança 95%	p
Náusea	0,78	0,27-2,28	0,65
Convulsões	3,87	1,1-13,63	0,03
Confusão mental	2,96	1,00-8,74	0,04
Torporoso	10,58	1,04-107,63	0,04
Hipertensão arterial sistêmica	19,71	2,16-179,99	0,008
Dosagem de ureia no sangue >40mg/dL no 1D	4,25	1,44-12,5	0,009
Cultura positiva para <i>Cryptococcus</i> spp. de outro sítio	3,52	1,21-10,25	0,02
Cultura positiva para <i>Cryptococcus</i> spp. no sangue	3,26	1,09-9,77	0,03
Cultura positiva para <i>Cryptococcus</i> spp. na pele	6,6	0,568-76,64	0,13
Pneumonia	4,72	1,28-17,47	0,02
Edema cerebral por TC	10,58	1,04-107,63	0,046
Dilatação ventricular por TC	10,58	1,04-107,63	0,046
Internação em UTI	10	3,35-29,81	<0,001
Cultura positiva para <i>Cryptococcus</i> spp. de LCR no 7D	1,24	0,24-6,33	0,79
Tinta da China positiva no LCR no 14D	1	-	-
Cultura positiva para <i>Cryptococcus</i> spp. no LCR no 14D	6,25	1,30-29,94	0,02
Dosagem de ureia no sangue > 40 mg/dL no 14D	14,74	1,76-124,09	0,013

TC, tomografia computadorizada do crânio; LCR, líquido cefalorraquidiano; UTI, Unidade de Terapia Intensiva; 7D, 7º dia de internação; 14D, 14º dia de internação

As variáveis que apresentaram associação, com diferença significativa, com óbito foram: convulsão, confusão mental e estado torporoso, comorbidade de hipertensão arterial sistêmica, cultura positiva para *Cryptococcus* spp. em sítios extra neurais (sangue e pele), pneumonia na internação, edema cerebral e dilatação ventricular por TC, internação em UTI, ureia no sangue acima de 40mg/dL no 1D e cultura positiva no LCR no 14D. Não foi apresentada associação para a variável de exame de Tinta da China positiva no LCR no 14D, pois todos os pacientes que apresentaram resultado positivo (9/9; 100%) neste exame foram a óbito.

4.3.2 Análise múltipla para desfecho simples de óbito hospitalar

As variáveis selecionadas para esta análise foram: idade, contagem de leveduras no LCR no 1D-log, hipertensão arterial sistêmica, e diagnóstico de edema cerebral e dilatação ventricular por exame de tomografia computadorizada do crânio. As variáveis referentes ao diagnóstico de hipertensão arterial sistêmica e edema cerebral e dilatação ventricular por TC foram unificados, devido ao número de observações e porque a maioria das observações foi de pacientes que evoluíram a óbito (10/13). Esta variável foi chamada de HAS ou comprometimento neurológico por TC (HAS/CNTC). Os resultados referentes a este modelo podem ser observados na Tabela 20. Todas as variáveis apresentaram associação significativa em relação ao óbito ($p < 0,01$). A variável que apresentou significância estatística mais evidente foi HAS/CNTC (OR= 35,68; IC 95%= 4,97-256,31; $p < 0,001$).

Tabela 20 - Análise múltipla por Regressão Logística das variáveis associadas ao óbito hospitalar em 90 pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)

Variável	Odds Ratio	Intervalo de Confiança 95%	<i>p</i>
Idade (anos)	1,08	1,02 - 1,15	0,008
Contagem de leveduras no LCR no 1D-log (log.)	1,66	1,21 - 2,28	0,002
HAS/CNTC	35,68	4,97 - 256,31	<0,001

log., escala logarítmica; hipertensão arterial sistêmica ou comprometimento neurológico por tomografia computadorizada

A acurácia do modelo escolhido (variáveis: idade, contagem de leveduras no LCR no 1D-log e HAS/CNTC) foi de 83,33% para o ponto de corte de 0,5. Neste caso, a sensibilidade e especificidade foram de 54,55% e 92,65%, respectivamente (valor preditivo positivo=70,59%; valor preditivo negativo=86,3).

O modelo apresentou bondade do ajuste alta tanto no Teste de Pearson, quanto no Teste de Hosmer-Lemeshow, com p de 0,96 e 0,99, respectivamente. Estas informações mostram que os resultados deste modelo não são diferentes dos valores observados.

A variável categórica de dosagem de ureia no sangue do 1D foi testada no modelo e esteve associada (OR=6,16; IC 95%=1,31-29,00; $p= 0,02$); no entanto, a inclusão desta variável levou à perda da precisão devido ao aumento do erro padrão das outras estimativas, como HAS/CNTC (IC 95% aumentou para 6,30-482,27). Além disso, o número de observações disponíveis para esta variável foi menor (número de observações=83). Além

disso, foi observada a diminuição do teste de bondade de ajuste (Hosmer-Lemeshow com $p = 0,21$). Por este motivo, ela foi retirada do modelo. Tais análises podem ser observadas no Apêndice 7.

Foi possível notar padrões de observações com valores extremos em relação à maioria das variáveis (Figura 15), sejam por observações influentes (com *delta deviance* acima de 4) ou *outliers* (observações com valores 3 vezes acima da média do *leverage* - 0,135).

Figura 15 – Figura referente ao padrão de distribuição das observações, influentes e *outliers*, determinados pelo modelo de análise múltipla para óbito hospitalar. Foram utilizadas as variáveis idade, contagem de leveduras no líquido cefalorraquidiano no LCR no 1D-log e HAS/CNTC, em 96 pacientes com neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo 08/2012 a 12/2013 e 01/ 2015 a 08/2017)

A exclusão destas observações indicou que as associações permaneceram no modelo ($p \leq 0,05$). Além disso, quando as observações influentes foram retiradas houve aumento da OR em todas as variáveis, como em contagem de leveduras no LCR no 1D-log que aumentou de 1,66 para 2,15 e em HAS/CNTC que aumentou de 17,32 para 324,8 (Tabela 21). Quando os *outliers* foram retirados houve aumento na associação contagem de leveduras no LCR no 1D-log com óbito hospitalar de 1,66 para 2,14 (Tabela 22).

Tabela 21 - Análise múltipla por Regressão Logística, sem as observações influentes, das variáveis associadas ao óbito hospitalar em 87 pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)

Variável	Odds Ratio	Intervalo de confiança 95%	p
Idade (anos)	1,11	1,027-1,19	0,008
Contagem de leveduras no LCR no 1D-log (log.)	2,15	1,33-3,47	0,002
HAS/CNTC	324,80	11,40-9254,30	0,001

log., escala logarítmica; hipertensão arterial sistêmica ou comprometimento neurológico por tomografia computadorizada

Tabela 22 - Análise múltipla por Regressão Logística sem os *outliers*, das variáveis associadas ao óbito hospitalar em 85 pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)

Variável	Odds Ratio	Intervalo de confiança 95%	p
Idade (anos)	1,07	1,00-1,14	0,04
Contagem de leveduras no LCR no 1D-log(log.)	2,14	1,30-3,54	0,003
HAS/CNTC	17,32	1,74-172,15	0,01

log., escala logarítmica; hipertensão arterial sistêmica ou comprometimento neurológico por tomografia computadorizada

A curva ROC foi elaborada a partir dos valores preditos para todas as amostras e variáveis testadas, e fornecidos pelo modelo múltiplo para prever o óbito hospitalar (Figura 16). A área abaixo da curva foi de 91,64% (IC 95% = 85,83 – 97,54%).

Figura 16 – Curva ROC utilizando as variáveis idade, contagem de leveduras no LCR no 1D, HAS/CNTC de 96 pacientes com neurocriptococose internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012 a 12/2013 e 01/2015 a 08/2017)

As variáveis utilizadas no modelo de Cox (Tabela 23) mostraram-se associadas com óbito hospitalar, em magnitude similar ($p < 0,05$) à observada em idade, contagem de leveduras no LCR no 1D-log e HAS/CNTC.

A observação de um dos eventos descritos em HAS/CNTC apresentou maior velocidade de ocorrência de óbito (HR=3,18; IC95%=1,11-1,70). As variáveis idade (HR=1,05; IC95%=1,00-1,09) e contagem de leveduras no LCR no 1D-log (HR=1,37; IC95%=1,28-7,87) também aumentaram a velocidade de ocorrência do óbito.

Tabela 23 - Análise de regressão de Cox das variáveis usadas no modelo de Regressão Logística, associadas ao óbito hospitalar de 90 pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)

Variável	Hazard Ratio	Intervalo de confiança 95%	p
idade (anos)	1,05	1,01-1,09	0,021
contagem de leveduras no LCR no 1D-log (log.)	1,37	1,11-1,70	0,003
HAS/CNTC	3,18	1,29-7,87	0,012

log., escala logarítmica; hipertensão arterial sistêmica ou comprometimento neurológico por tomografia computadorizada

Para avaliar os efeitos destas variáveis na sobrevida algumas foram categorizadas, de acordo com sua distribuição, para representar graficamente as variáveis contínuas nas curvas de Kaplan-Meier, até a ocorrência do óbito hospitalar (Figura 17). Como a mediana de idade dos pacientes foi de 38 anos, foi criada a variável categórica com esta medida para classificar 2 grupos de pacientes: idade menor ou igual ou maior que 38 anos. A mesma categorização foi realizada com a variável contagem de leveduras no LCR no 1D-log. É possível observar que os pacientes com idade maior do que 38 anos, ou aqueles que apresentaram mais de 200 cél. de leveduras/mL de LCR no 1D ou, ainda, os que apresentaram uma das alterações contidas na variável HAS/CNTC apresentaram menor sobrevida. Dado que as curvas não se cruzaram, foi assumido que a proporcionalidade dos riscos foi mantida durante todo o período de internação para todas as variáveis.

A probabilidade de sobrevida no 50º dia de internação foi: 90% para pacientes com idade menor que 38 anos contra 73% para o restante, 97% para aqueles com <200 cél.de leveduras/mL no LCR no 1D e 69% para o grupo com valores acima e de 51% para pacientes que apresentaram um dos eventos descritos na variável HAS/CNTC contra 87% dos demais.

Figura 17 - Curvas de sobrevida até a ocorrência do óbito hospitalar, de acordo com as variáveis selecionadas para o modelo de análise múltipla. (A) Idade, (B) contagem de leveduras no LCR no 1D e (C) HAS/CNTC

4.3.3 Análise univariável em relação ao desfecho composto

O desfecho composto foi definido pela ocorrência de: óbito hospitalar, encaminhamento para UTI durante a internação ou, ainda, a recidiva da criptococose até 6 meses após alta hospitalar. A genotipagem, a resistência ao FCZ, a tolerância a AMB e a heterorresistência ao FCZ não mostraram relação com o desfecho composto (Tabela 24).

Tabela 24 - Análise univariável das variáveis: genótipo, resistência a FCZ, tolerância à AMB e alta heterorresistência ao FCZ, em relação à ocorrência de um dos eventos descritos no desfecho composto, em pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)

Variável	Total N/Total (%)	Pessoas com desfecho N/Total (%)	Sobreviventes N/Total (%)	<i>p</i>
Genótipo VNI	77/96(80,2%)	37/48(77,1%)	38/45(84,4%)	0,43
Genótipo VNII	16/96(16,7%)	8/48(16,7%)	7/45(15,6%)	1,00
Genótipo VGII	3/96(3,1%)	3/48(6,3%)	0/45(0%)	0,24
Resistência a FCZ (MIC $\geq$ 16mg/L)	27/96(28,1%)	15/48(31,3%)	12/45(26,7%)	0,65
Tolerância a 1mg/L de AMB (TK $\geq$ 24h)	57/96(59,4%)	30/48(62,5%)	25/45(55,6%)	0,53
Alta heterorresistência (NHF $\geq$ 32mg/L)	87/96(90,6%)	44/48(91,7%)	40/45(88,9%)	0,73

FCZ, fluconazol; AMB, anfotericina B; MIC, *Minimum Inhibitory Concentration* (Concentração Inibitória Mínima); TK, *Time Kill*

Os resultados da análise univariável das variáveis categóricas e quantitativas em relação ao desfecho composto pode ser observado no Apêndice 8 e 9, respectivamente. As variáveis qualitativas que apresentaram diferença estatística significativa em relação ao desfecho composto foram: cultura positiva para *Cryptococcus* spp. no sangue, neurotoxoplasmose, pneumonia e cultura positiva para *Cryptococcus* spp. no LCR no 7D (Tabela 25).

Tabela 25 - Análise univariável das variáveis categóricas de prognóstico e que apresentaram $p \leq 0,20$ em relação a ocorrência de um dos eventos do desfecho composto nos pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)

Variáveis	Total N/Total (%)	Pessoas com desfecho N/total (%)	Pessoas sem desfecho N/total (%)	<i>p</i>
Tontura	15/90 (16,7%)	11/45 (24,4%)	4/45 (8,9%)	0,08
Anorexia	9/90 (10%)	2/45 (4,4%)	7/45 (15,6%)	0,15
Tinta da China positiva no LCR no 1D	79/90 (87,8%)	42/45 (93,3%)	37/45 (82,2%)	0,19
Cultura positiva para <i>Cryptococcus</i> spp. no sangue	18/89 (20,2%)	14/45 (31,1%)	4/44 (9,1%)	0,01
Pneumonia	11/90 (12,2%)	9/45 (20%)	2/45 (4,4%)	0,05
Neurotoxoplasmose	9/90 (10%)	8/45 (17,8%)	1/45 (2,2%)	0,03
Edema cerebral por TC	4/90 (4,4%)	4/45 (8,9%)	0/45 (0%)	0,11
Dilatação ventricular por TC	4/90 (4,4%)	4/45 (8,9%)	0/45 (0%)	0,11
Cultura positiva para <i>Cryptococcus</i> spp. no LCR no 7D	52/75 (69,3%)	32/37 (86,5%)	20/38 (52,6%)	0,002
Tinta da China positiva no LCR no 14D	48/66 (72,7%)	21/25 (84%)	27/41 (65,8%)	0,15

LCR, líquido cefalorraquidiano; 1D, 1º dia de internação; TC, Tomografia do crânio; UTI, Unidade de Terapia Intensiva; 7D, 7º dia de internação; 14D, 14º dia de internação

As variáveis que foram incluídas na análise devido à importância clínica e epidemiológica não apresentaram associação significativa com o desfecho. As variáveis que apresentaram diferença significativa foram escala de coma de Glasgow, contagem de leveduras no LCR no 1D, contagem de macrófagos no LCR do 1D, contagem de leveduras no LCR do 7D, Dosagem de ureia no sangue do 7D e contagem de leveduras no LCR do 14D composto (Tabela 26).

Tabela 26 - Análise univariável das variáveis quantitativas que apresentaram $p \leq 0,20$ e de importância clínica epidemiológica em relação a ocorrência de um dos eventos do desfecho composto nos pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emílio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)

Variáveis	Total Média (IIQ)	Pessoas com desfecho Média (IIQ)	Pessoas sem desfecho Média (IIQ)	<i>p</i>
Glasgow (escala de coma)	14 (15)	14 (14-15)	14 (15-15)	<0,001
Contagem de leveduras no LCR no 1D (células/mm ³)	749 (6-665)	1282 (73-1670)	217,2 (1-246)	<0,001
Contagem de macrófagos no LCR do 1D (%)	0,54 (0-0)	0,94 (0-2)	0,15 (0-0)	0,01
Dosagem de proteínas no LCR do 1D (mg/dL)	102,46 (36-104)	113,27 (35-86,5)	91,88 (41-125)	0,11
Dosagem de ureia no sangue do 1D (mg/dL)	33,41 (21-40)	37 (20-44)	29,22 (22-34)	0,15
MIC de AMB (mg/L)	0,22 (0,12-0,25)	0,23 (0,12-0,25)	0,22 (0,12-0,25)	0,73
MIC de FCZ (mg/L)	9,39 (1-16)	10,25 (1,5-16)	8,84 (1-16)	0,98
NHF (mg/L)	45,83 (32-64)	48,66 (32-64)	43,73 (32-64)	0,30
TK 1mg/L de AMB (horas)	27 (12-48)	29 (12-48)	26,92 (12-48)	0,58
Contagem de leveduras no LCR no 7D células (mm ³)	211 (1-102)	296 (1-187)	12,58 (1-24)	0,002
Contagem de macrófagos no LCR do 7D (%)	1,07 (0-0,5)	0,91 (0-0)	1,22 (0-2)	0,09
Dosagem de ureia no sangue do 7D (mg/dL)	53,44 (25,5-62,5)	68,97 (41-81)	37,02 (24-54)	<0,001
Contagem de leveduras no LCR no 14D (células/mm ³)	56,24 (0-26)	37 (1-40)	67,92 (0-7)	0,047
Contagem de macrófagos no LCR do 14D (%)	0,87 (0-0)	1,41 (0-2)	0,53 (0)	0,06
Contagem de linfócitos no LCR do 14D (%)	83,98 (84,5-94)	80,09 (83-92)	86,5(85-95)	0,18
Dosagem de ureia no sangue do 14D (mg/dL)	48 (24-61)	57,62 (24-65)	39,79 (28-48)	0,20
Tempo de internação (dias)	40,68 (23-54)	43,87 (19,5-57)	37,28 (25-43)	0,33
Tempo terapia de indução (dias)	31,10 (20-40)	32,60 (21-42)	29,60 (19-40)	0,34

IIQ, intervalo interquartil 25-75%; LCR, líquido cefalorraquidiano; 1D, 1º dia de internação; 7D, 7º dia de internação; 14D, 14º dia de internação; MIC, *Minimum Inhibitory Concentration* (Concentração Inibitória Mínima); FCZ, fluconazol; AMB, anfotericina B; TK, *Time Kill* (Tempo para morte)

Do mesmo modo que realizado para óbito hospitalar, foram testadas versões na forma de logaritmo natural para a contagem de leveduras. As variáveis quantitativas que apresentaram associação com diferença significativa foram: escala de coma de Glasgow, contagem de leveduras no LCR no 1D-log, contagem de macrófagos no LCR do 1D, contagem de leveduras no LCR no 7D, Dosagem de ureia no sangue do 7D (Tabela 27). A Figura 18 ilustra as variáveis de contagem de leveduras do 1D e do 7 D e dosagem de uréia agrupadas em decis para a análise da evolução da Odds.

Tabela 27 - Análise univariável das variáveis quantitativas associadas ao desfecho composto em pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)

Variáveis	Odds Ratio	Intervalo de Confiança 95%	p
Glasgow (escala de coma)	0,13	0,03-0,59	0,008
Contagem de leveduras no LCR no 1D (log.)	1,47	1,22-1,79	<0,001
Contagem de macrófagos no LCR do 1D (%)	1,91	1,06-3,44	0,03
Dosagem de proteínas no LCR do 1D (mg/dL)	1,00	0,99-1,00	0,59
Dosagem de ureia no sangue do 1D (mg/dL)	1,02	0,99-1,05	0,08
MIC de AMB (mg/L)	0,96	0,06-16,20	0,97
MIC de FCZ (mg/L)	1,01	0,98-1,04	0,62
NHF (mg/L)	1,00	0,99-1,02	0,35
TK 1mg/L de AMB (horas)	1,00	0,98-1,02	0,64
Dosagem de ureia no sangue do 7D (mg/dL)	1,03	1,01-1,059	0,004
Contagem de leveduras no LCR no 7D (log.)	1,38	1,11-1,71	0,003
Contagem de macrófagos no LCR do 7D (%)	0,96	0,81-1,13	0,65
Contagem de leveduras no LCR no 14D (log.)	1,13	0,84-1,52	0,40
Contagem de macrófagos no LCR do 14D (%)	1,30	0,95- 1,79	0,09
Contagem de linfócitos no LCR do 14D (%)	0,98	0,96 -1,01	0,27
Dosagem de ureia no sangue do 14D (mg/dL)	1,02	0,99- 1,04	0,05

Log., escala logarítmica; LCR, líquido cefalorraquidiano; 1D, 1º dia de internação; 7D, 7º dia de internação; 14D, 14º dia de internação, AMB, anfotericina B; FCZ, fluconazol; TK, *Time Kill* (Tempo para morte)

Figura 18 - Gráficos das variáveis quantitativas associadas ao desfecho composto, determinadas no 1º dia de internação para análise da evolução da Odds. A) Contagem de leveduras no LCR no 1D, B) Escala de coma de Glasgow, C) Contagem de macrófagos 1D, D) Dosagem de ureia 1D

Apenas a variável referente a dosagem de ureia do 1D foi utilizada na forma de variável categórica, ou seja, quando dosagem de ureia > 40mg/dL e menor que este valor.

A análise univariável das variáveis categóricas associadas a ocorrência de um dos eventos descritos no desfecho composto consta da Tabela 28. As variáveis referentes ao diagnóstico de edema cerebral e à dilatação ventricular por TC se comportaram como desfecho, pois todos os pacientes que apresentaram estas variáveis desenvolveram um dos eventos apresentados no desfecho composto, por este motivo não prosseguiram na análise. As variáveis categóricas que apresentaram associação com diferença significativa com o desfecho composto foram: relato de tonturas e anorexia no momento da internação, cultura positiva para *Cryptococcus* spp. no sangue, descrição de neurotoxoplasmose e pneumonia e cultura positiva para *Cryptococcus* spp. no LCR no 7D.

Tabela 28 - Análise univariável das variáveis categóricas associadas a ocorrência de um dos eventos descritos no desfecho composto nos pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)

Variáveis	Odds Ratio	Intervalo de Confiança 95%	p
Tonturas	3,31	0,97-11,36	0,05
Anorexia	0,25	0,05-1,28	0,09
Tinta da China positiva no LCR no 1D	3,02	0,75-12,26	0,12
Dosagem de ureia no sangue do 1D	2,17	0,77- 6,18	0,14
Cultura positiva para <i>Cryptococcus</i> spp. no sangue	4,51	1,35-15,09	0,01
Neurotoxoplasmose	9,51	1,14-79,60	0,03
Pneumonia	5,37	1,09-26,49	0,03
Edema cerebral por TC	1	-	-
Dilatação ventricular por TC	1	-	-
Cultura positiva para <i>Cryptococcus</i> spp. no LCR no 7D	5,76	1,85-17,96	0,003
Tinta da China positiva no LCR no 14D	2,72	0,78- 9,49	0,11

LCR, líquido cefalorraquidiano; TC, tomografia computadorizada do crânio; 7D, 7º dia de internação; 14D, 14º dia de internação

4.3.4 Análise múltipla para desfecho composto

As variáveis selecionadas nesta análise foram: contagem de leveduras no LCR no 1D-log, cultura positiva para *Cryptococcus* spp. no sangue e neurotoxoplasmose (Tabela 29). As variáveis referentes a contagem de leveduras no LCR no 1D e descrição de neurotoxoplasmose na internação apresentaram associação significativa evidente em relação a

ocorrência de um dos eventos do desfecho composto (contagem de leveduras no LCR no 1D-log: OR=1,50; IC 95%=1,20-1,86; $p < 0,001$; e neurotoxoplasmose: OR=18,62; IC 95%=1,85-187,5; $p = 0,01$). A variável referente a cultura positiva para *Cryptococcus* spp., no sangue não apresentou associação significativa (OR=3,30; IC 95% = 0,86-12,59; $p = 0,08$), no entanto, quando excluída do modelo, as demais variáveis apresentavam menor associação ou menor valor de OR e por esse motivo ela foi mantida.

Tabela 29 - Análise múltipla por regressão logística das variáveis associadas ao desfecho composto em 89 pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)

Variável	Odds Ratio	Intervalo de confiança 95%	<i>p</i>
Contagem de leveduras do 1D-log (log.)	1,50	1,20-1,86	<0,001
Cultura positiva para <i>Cryptococcus</i> spp., no sangue	3,30	0,86-12,59	0,08
Neurotoxoplasmose	18,62	1,85-187,50	0,01

Log., escala logarítmica

A acurácia do modelo escolhido foi de 74,16% para o ponto de corte de 0,5. A sensibilidade foi de 80% e especificidade de 68,18% (valor preditivo positivo 72%; valor preditivo negativo 76,92%). O modelo apresentou bondade do ajuste alta, tanto no Teste de Pearson quanto no Teste de Hosmer-Lemeshow, com $p = 0,73$ e 0,23 respectivamente.

De acordo com a Figura 19, foi possível notar uma observação influente e dois *outliers* (observações com valores 3 vezes acima da média do *leverage* - 0,266).

Figura 19 - Figura referente ao padrão de distribuição das observações, influentes e *outliers*, determinados pelo modelo de análise múltipla para o desfecho composto. Foram utilizadas as variáveis contagem de leveduras do LCR do 1D-log, cultura positiva para *Cryptococcus* spp. no sangue e neurotoxoplasmose

A exclusão da variável influente das observações (Tabela 30) indicou que apenas a variável referente a contagem de leveduras no LCR do 1D permaneceu com a mesma associação, sem alteração da OR ou do IC 95%. A variável relacionada à cultura positiva para *Cryptococcus* spp. no sangue apresentou mudança na OR de 3,30 para 3,28 mantendo a associação em relação desfecho composto ($p=0,08$). A variável de descrição de neurotoxoplasmose foi omitida do modelo devido ao pequeno número de observações. Quando os *outliers* foram retirados (Tabela 31) a associação foi mantida para a variável de contagem de leveduras no LCR do 1D-log com mudança na OR de 1,50 para 1,71. A presença de cultura positiva para *Cryptococcus* spp. no sangue apresentou aumento a OR de 3,30 para 3,70 no entanto, ainda sem associação estatística (IC95%=0,086-12,60; $p=0,07$). A descrição de neurotoxoplasmose manteve associação com o desfecho composto, mas com menor valor de OR (OR=15,8; IC95%=1,49-166,9; $p=0,02$).

Tabela 30 - Análise múltipla por Regressão Logística sem as observações influentes, das variáveis associadas ao desfecho composto em 80 pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)

Variável	Odds Ratio	Intervalo de confiança 95%	p
Contagem de leveduras do 1D (log.)	1,50	1,20-1,87	<0,001
Cultura positiva para <i>Cryptococcus</i> spp., no sangue	3,28	0,86-12,56	0,08
Neurotoxoplasmose	1	-	-

Log., escala logarítmica

Tabela 31 - Análise múltipla por Regressão Logística sem os *outliers*, das variáveis associadas ao desfecho composto em 78 pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)

Variável	Odds Ratio	Intervalo de confiança 95%	p
Contagem de leveduras do 1D (log.)	1,71	1,27-2,29	<0,001
Cultura positiva para <i>Cryptococcus</i> spp., no sangue	3,70	0,89-15,30	0,07
Neurotoxoplasmose	15,8	1,49-166,95	0,02

Log., escala logarítmica

A curva ROC foi elaborada, a partir dos valores preditos na amostra total, para as variáveis testadas pelo modelo múltiplo para predizer a ocorrência de um dos eventos do desfecho composto (Figura 20). A área abaixo da curva foi de 83,16% (IC 95% = 74,54-91,77%).

Figura 20 - Curva ROC utilizando as variáveis associadas ao desfecho composto em 89 pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)

As variáveis de contagem de leveduras no LCR no 1D-log e cultura positiva para *Cryptococcus* spp. no sangue mostraram-se associadas de forma significativa ($p < 0,05$) com o desfecho composto na regressão de Cox (Tabela 32). O aumento do logaritmo da contagem de leveduras no 1D pode acelerar em mais de 34% a ocorrência de um dos eventos do desfecho composto e a cultura positiva para *Cryptococcus* spp. no sangue pode aumentar esta velocidade de ocorrência em mais de 2 vezes. Embora o diagnóstico de neurotoxoplasmose tenha apresentado maior velocidade de ocorrência do desfecho composto, a associação não foi significativa (IC95% 0,97-4,62; $p = 0,06$).

Tabela 32- Regressão de Cox das variáveis usadas no modelo de Regressão Logística, associadas à ocorrência de um dos eventos descritos no desfecho composto, em 89 pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017)

Variável	Hazard Ratio	Intervalo de confiança 95%	p
Contagem de leveduras no LCR do 1D (log.)	1,34	1,16-1,56	0,000
Cultura positiva para <i>Cryptococcus</i> spp. no sangue	2,10	1,09-4,04	0,027
Neurotoxoplasmose	2,12	0,97-4,62	0,060

Log., escala logarítmica

A mediana da contagem células de leveduras no LCR no 1D (200 cél.de leveduras/mm³) foi utilizada na categorização desta variável para as curvas de sobrevida. Os pacientes que apresentaram carga fúngica ≥ 200 cél. de leveduras/mm³ no 1D, cultura positiva no sangue ou diagnóstico de neurotoxoplasmose apresentaram menor sobrevida em relação aos pacientes que receberam alta hospitalar, não foram encaminhados a UTI ou que não tiveram

recidiva da criptococose em até 6 meses após a alta. Uma vez que as curvas não se cruzaram, assumiu-se que a proporcionalidade dos riscos foi mantida, desde a internação até 6 meses da alta hospitalar (Figura 21). A probabilidade de sobrevida ou, dos pacientes não desenvolverem um dos desfechos, 100 dias após a internação é de 72% para os que pacientes com <200 cél. de leveduras/ mm^3 no LCR do 1D e de 48% para os casos em que a contagem de leveduras no LCR no 1D foi ≥ 200 cél. de leveduras/ mm^3 . Para os pacientes que não apresentaram cultura positiva foi de 66,2% e de 33% para os que apresentaram cultura positiva para *Cryptococcus* spp. no sangue. Os pacientes que não apresentaram diagnóstico de neurotoxoplasmose exibiram 62,96% de probabilidade de sobrevida e de 33,3% para aqueles com neurotoxoplasmose. As curvas de sobrevida ajustadas pelas próprias variáveis mantiveram a proporcionalidade dos riscos

Figura 21 - Curvas de sobrevida até a ocorrência de um dos eventos do desfecho composto, de acordo com as variáveis usadas no modelo de análise múltipla. (A) Contagem de leveduras no 1D, (B) Cultura positiva para *Cryptococcus* spp. no sangue e (C) neurotoxoplasmose

5 DISCUSSÃO

Estimativas sobre a incidência de meningite por *Cryptococcus*, com base em resultados de antigenemia, apontam que, em 2014, ocorriam 223 100 casos da doença associada à aids no mundo, resultando em 181 100 mortes, anualmente (RAJASINGHAM et al., 2017). A criptococose é uma doença grave e global, com maior impacto em países em desenvolvimento pela dificuldade de acesso à medicação, tanto para a micose, quanto para a doença subjacente mais comum, a aids (WHO, 2018). Similar ao observado na literatura, os 96 casos de neurocriptococose do Instituto de Infectologia Emilio Ribas ocorreram predominantemente portadores do HIV (96,7%) e, como em outros estudos, a maioria do sexo masculino (77,1%), refletindo a população mais atingida da epidemia de AIDS (MDODO et al., 2011; LEE et al., 2012; AGUDELO et al., 2015; CHEN et al., 2015; AGUIAR et al., 2017; ARECHAVALA et al., 2018; SHAHEEN et al., 2018).

A letalidade hospitalar observada nesta pesquisa foi de 26,9% e de acordo com outros estudos brasileiros, esta taxa pode variar de 25 a 74%, sobretudo nas primeiras semanas de terapia (MOREIRA et al., 2006; SILVA et al., 2008; MORA et al., 2012; MASCARENHAS-BATISTA et al., 2013; AGUIAR et al., 2017; AZAMBUJA et al., 2018; NUNES et al., 2018).

Nas Américas, os agentes etiológicos da meningite criptocócica são, em sua extensa maioria, *C. neoformans*, também confirmado nesta série de pacientes (TRILLES et al., 2008; FREIRE et al., 2012; MATOS et al., 2012; MORA et al., 2012; ANDRADE-SILVA et al., 2013; AGUIAR et al., 2017; NUNES et al., 2018; WIRTH; et al., 2018). Dos 3 casos de infecção por *C. gattii*, 2 eram HIV negativos, e dentre esses, um deles foi diagnosticado com imunodeficiência primária. Se postula que *C. gattii* mostre maior virulência, se comparado a *C. neoformans*, o que poderia justificar que indivíduos sem imunossupressão aparente podem ser infectados por essa espécie. No entanto, outros fatores podem estar associados e interferir na resposta imune dos pacientes, como idade e presença de outras comorbidades (OLIVEIRA et al., 2008; PAULA et al., 2015, 2015; AMARAL et al., 2016). Como descrito em estudos realizados nas Américas, o genótipo VNI sobrepuiu os demais, e entre *C. gattii* o genótipo foi exclusivamente VGII (COGLIATI, 2013).

Devido à má resposta ao tratamento, algumas infecções causadas por *C. gattii*, necessitam tanto de terapia mais prolongada e/ou intervenção cirúrgica (BYRNES et al.,

2011), devido maior virulência e também menor suscetibilidade aos antifúngicos (CHEN et al., 2000; GOMEZ-LOPEZ et al., 2008; SILVA et al., 2012; TRILLES et al., 2012). O genótipo VGII é conhecido por sua maior virulência, menor suscetibilidade ao FCZ e consequentemente por sua influência para o pior prognóstico em relação aos demais (KIDD et al., 2004; BYRNES et al., 2010; HAGEN et al., 2010; CHATURVEDI e CHATURVEDI, 2011; NGAMSKULRUNGROJ et al., 2011; SMITH et al., 2014) e está relacionado a cepas hipervirulentas, como as responsáveis pelo óbito de humanos e animais na Ilha de Vancouver e noroeste dos EUA (FRASER et al., 2005; MACDOUGALL et al., 2007; HARRIS et al., 2011). No entanto, não observamos associação entre os genótipos e o desfecho desfavorável, tanto ao óbito quanto ao desfecho composto analisado.

Os indicadores de suscetibilidade aos antifúngicos não estiveram associados aos desfechos. Atualmente não se recomenda rotineiramente a determinação da suscetibilidade de AMB e FCZ pelo MIC, já que permanece incerta a correlação destes resultados com a resposta clínica. Além disso, a determinação de breakpoints para *Cryptococcus* spp. permanece inexistente devido à ausência de estudos capazes de correlacionar resultados de MIC, ou de outro método, com a evolução clínica (ALLER et al., 2000; PFALLER et al., 2005; DANNAOUI et al., 2006; TSENG et al., 2013; CÓRDOBA et al., 2015; VENA et al., 2018). Desse modo, ainda não é possível categorizar um isolado de *Cryptococcus* spp. como resistente ou sensível e, consequentemente, prever a evolução clínica com base nesse critério.

ESPINEL-INGROFF et al. (2012a,2012b) propuseram a utilização de pontos de corte epidemiológicos (*Epidemiological Cutoff Values- ECV's*) determinados por microdiluição em caldo de acordo com o CLSI, uma vez que *breakpoints* clínicos ainda não estão disponíveis para o gênero. A determinação do *breakpoint* clínico é baseada em diversos parâmetros, dentre eles a distribuição de MIC em isolados clínicos, resposta clínica dos pacientes e regime terapêutico utilizado, biodisponibilidade, farmacocinética e farmacodinâmica do fármaco e estudos em modelo animal, possibilitando assim a predição da evolução clínica de acordo com o MIC (TURNIDGE et al., 2006; DALHOFF et al., 2009). Os *ECV's* são determinados pela distribuição de valores de MIC de 95 a 97% dos isolados, em uma curva Gaussiana de distribuição normal, de modo que os isolados são classificados como selvagens quando situados dentro desta distribuição, e em não-selvagens quando excedem, provavelmente devido à mecanismos de resistência adquirida (PFALLER et al., 2011; ESPINEL-INGROFF et al., 2012a, 2012b).

Observamos 28,1% (27/96) de isolados resistentes a FCZ, de acordo com o critério de $MIC \geq 16$ mg/L (ALLER et al., 2000; PFALLER et al., 2005; DANNAOUI et al., 2006), no entanto, a utilização de *ECV's* foi proposta e sugeridos valores de MIC de 8mg/L para isolados VNI, *C. gattii* sem identificação genotípica, VGI, VGIIa e VGIII; de 16mg/L para *C. neoformans* são genotipados, VNII e VGIV; e 32mg/L para VGII (ESPINEL-INGROFF et al., 2012b). De acordo com estes critérios, os isolados VNI e VGII não-selvagens permaneceram as mesmas classificadas como resistentes e, em VNII, apenas 1 isolado foi considerado não-selvagem ($MIC > 16$ mg/L).

Os mecanismos mais comuns de resistência à azóis estão bem descritos em *Saccharomyces cerevisiae* e espécies patogênicas de *Candida*, como *C. albicans* e *C. glabrata*. Estas espécies são filogeneticamente distantes de *C. neoformans*, mas sabe-se que nelas ocorrem vários mecanismos que podem estar envolvidos com resistência, incluindo: menor acúmulo intracelular de antifúngicos azólicos associado com maior expressão gênica de proteínas de efluxo celular AFR1 e MDR1, superprodução de enzima alvo dos azóis, implementação de vias metabólicas alternativas e/ou alterações na molécula 14- α -demetilase. No gênero *Cryptococcus*, modificações na composição da membrana celular decorrentes de alterações na biossíntese do ergosterol são um dos mecanismos associados à resistência ao FCZ (JOSEPH-HORNE et al., 1995). Mutações pontuais no gene *ERG11* foram relatadas, inclusive em isolados de pacientes com Aids associadas a criptococose recidivante (RODERO et al., 2003; GAGO et al., 2017). Este mecanismo baseia-se alterações de aminoácidos como glicina e asparagina que diminuem a afinidade do azol ao sítio de ação (GAGO et al., 2017). Outro mecanismo molecular de resistência ao FCZ descrito em *C. neoformans* é o efluxo do antifúngico provocado por bombas de efluxo. Embora numerosos genes já tenham sido associados a bombas de efluxo, atualmente apenas um dos transportadores ABC, o AFR1, tem sido atribuído ao FCZ (POSTERARO et al., 2003; CHANG et al., 2018). Alterações fenotípicas têm sido observadas em células resistentes a FCZ, como diminuição na taxa de crescimento além do aumento do tamanho celular, provavelmente decorrente da duplicação de genes e do conteúdo de DNA (SMITH et al., 2015; ALTAMIRANO et al., 2017).

Diferença significativa em relação ao MIC de FCZ e *C. neoformans* e *C. gattii* e foi observada e, mesmo considerando apenas 3 isolados, a menor suscetibilidade em *C. gattii* é descrita na literatura (GOMEZ-LOPEZ et al., 2008; CHONG et al., 2010; CHOWDHARY et al., 2011; TRILLES et al., 2012; NISHIKAWA et al., 2019). Além disso, diferença nos valores de MIC de AMB e FCZ entre os genótipos VNI e VNII também foi observada. De modo semelhante, CHONG et al., (2010) observou diferença em relação a suscetibilidade de

FCZ sendo VNII mais suscetível que VNI, o que confirma a importância da caracterização de isolados clínicos.

De acordo com o critério utilizado, não observamos isolados resistentes à AMB, ou seja, com $MIC \geq 2$ mg/L. ESPINEL-INGROFF et al., (2012a) sugeriram valores de MIC de 0,5 a 1mg/L para *C. neoformans* e *C. gattii* e propuseram ainda *ECV*'s de acordo com o genótipo sendo 0,5 mg/L para VNI, VGI e VGIIa; e 1mg/L para VGII e *C. neoformans* e *C. gattii* sem caracterização genotípica. De acordo com este critério, apenas 1 isolado VNI de nosso estudo apresentou *ECV* acima de 0,5 mg/L (0,64mg/L) enquanto para as demais, o MIC foi < 1mg/L para AMB.

A resistência natural de *Cryptococcus* spp. à AMB não foi relatada na literatura consultada, mas a resistência adquirida, apesar de rara foi descrita em trabalhos antigos (DICK et al., 1980; WALSH e PIZZO, 1988; KELLY et al., 1994). As cepas resistentes apresentaram, de modo geral, alterações na composição dos esteróis das membranas, ou seja, diminuição ou ausência do ergosterol e substituição por outros esteróis, o que implica em menor ligação da AMB (POWDERLY, 1988; KELLY et al., 1994). Foram, também, descritas mutações na enzima alvo e na via de biossíntese de ergosterol, por exemplo, 5,6-dessaturase, ou um aumento no efluxo da droga a partir da célula fúngica como mecanismos de resistência (KELLY et al., 1994; JOSEPH-HORNE et al., 1995). Além disso, a relação entre mutações genéticas em *Cryptococcus* spp. e valores de MIC elevados para este agente ainda não foi totalmente determinada (PERFECT e COX, 1999).

Observamos que de acordo com o teste de curvas de morte, às 12h de exposição à AMB, menos da metade dos isolados de *C. neoformans* e nenhum isolado de *C. gattii* apresentou atividade fungicida. Estudos prévios mostraram que a maioria dos isolados apresentam morte até 12h de exposição a 1mg/L de AMB, dentre eles PAPPALARDO et al., (2009), que observaram atividade fungicida às 12h em 82,5% de 40 isolados de *C. neoformans*. Um estudo realizado por nosso grupo também mostrou TK12 para 91,38% e 88% de isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* respectivamente (OLIVEIRA et al., 2017).

A atividade fungicida de 80% dos isolados foi observada após TK48 e 6 isolados VNI não apresentaram atividade fungicida, apresentando colônias mesmo após exposição a 1mg/l de AMB por 72h. CÓRDOBA et al., 2015 também observou que 5 cepas não apresentaram TK e classificou-os como tolerantes. A tolerância aos fármacos é definida pela capacidade que algumas células apresentam de sobreviver a concentrações altas de fármaco, no entanto, não apresentam modificação do MIC (DELARZE e SANGLARD, 2015). Além disso, métodos capazes de detectar estas células, como a Curva de morte, podem apresentar melhor

correlação com a evolução clínica do que o MIC, para fármacos fungicidas como a AMB (CÓRDOBA et al., 2015). Outro evento já relatado em outros estudos foi o crescimento de colônias após a determinação do TK, ou seja, após a morte de 99.9% das células de *Cryptococcus* spp. (BURGESS; HASTINGS, 2000; RODERO et al., 2000a, 2000b; PAPPALARDO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2017). Observamos a ocorrência deste fenômeno em 13 (13,5%;13/96) isolados sendo 10 do genótipo VNI e 3 VNII. Recrescimento em 6,9 % de 58 isolados *C. neoformans* e em 12% de 25 de *C. gattii* foi observado em estudo anterior (OLIVEIRA et al., 2017). Resultado semelhante foi observado por PAPPALARDO et al. (2009), ao relatar recrescimento em 17,5% de cepas *C. neoformans*.

A resistência e a tolerância a AMB podem, ainda, ocorrer devido à maior formação de enzima catalase, produzida por cepas resistentes de *C. neoformans*, o que impediria a ação oxidativa da AMB (SOKOL-ANDERSON et al., 1988). Mecanismos de virulência como produção de melanina e capsula também podem influenciar na menor suscetibilidade frente AMB, devido a sua capacidade de proteção contra danos oxidativos (POLACHECK et al., 1990; WANG et al., 1995; VAN DUIN et al., 2002; IKEDA et al., 2003; ZARAGOZA et al., 2008). Cepas clínicas após indução *in vitro* de produção de cápsula apresentaram maiores valores de MIC de AMB e menor atividade fungicida frente 1 µg/mL de AMB, em comparação com as mesmas cepas não induzidas (CÓRDOBA et al., 2011; VITALE et al., 2012). Outros fatores como aumento de enzimas do sistema antioxidante, como catalase e peroxidase, também podem contribuir com a resistência (SOKOL-ANDERSON et al., 1988). Deste modo, estudos caracterizando estas cepas, bem como a compreensão destes mecanismos frente AMB são necessários.

Em busca de mecanismos que possam explicar a falta de atividade *in vitro* de FCZ contra cepas clínicas de *Cryptococcus* spp., pesquisadores do *National Institute of Health*-NIH, Bethesda, EUA, desenvolveram alguns estudos para comprovar a existência de subpopulações capazes de crescer em concentrações acima do MIC (SIONOV et al., 2009).

Neste estudo, o fenômeno de heterorresistência ao FCZ em isolados do complexo *C. neoformans/C. gattii*, foi caracterizado de modo inédito no Brasil, e, confirmando os achados norte-americanos, verificamos que todos os isolados apresentaram subpopulações heterorresistentes ao fármaco, sendo a maioria com alto (≥ 32 mg/L) valor de NHF (SIONOV et al., 2009). Confirmamos, ainda, que a intensidade do fenótipo de heterorresistência não foi proporcional ao grau de suscetibilidade ao fármaco, determinado pelo MIC, ou seja, altos e baixos valores de NHF foram encontrados em isolados resistentes e o valor de NHF foi independente da espécie analisada, no entanto, sem associação com o óbito ou a gravidade da

meningite por *Cryptococcus* spp.. Todos os isolados de *C. gattii* apresentaram subpopulação altamente heterorresistentes e em *C. neoformans*, a maioria (71/76; 93,42%) dos isolados altamente heterorresistentes eram do genótipo VNI. Como observado em nosso trabalho, não há relatos, até o momento, de correlação entre NHF e genótipo. No entanto, linhagens clínicas referentes ao sorotipo A (VNI), apresentaram maior NHF do que ao sorotipo D (VNIV), equivalentes aos genótipos VNI e VNIV, respectivamente (SIONOV et al., 2009). Para *C. gattii*, cepas clínicas do sorotipo C apresentaram maiores valores de NHF do que do sorotipo B (VARMA e KWON-CHUNG, 2010).

A correlação entre valores de MIC e NHF não foi observada neste estudo confirmando, como outros relatos, a ausência de consenso entre estes testes. MONDON et al., 1999, analisaram o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos e NHF de cepas de 2 pacientes com neurocriptococose, um referente a primeiro episódio em indivíduo não Aids e no outro, um paciente com 6 recidivas da infecção. Todos os isolados foram analisados, inclusive os isolados seriados, e apresentaram diferentes valores de MIC de FCZ. No isolado do paciente de primeiro episódio de criptococose foi relatada resistência ao FCZ e como também na maioria das cepas do segundo paciente. No entanto o NHF de todos os isolados dos pacientes foi similar. YAMAZUMI et al., 2003, de outro modo, observaram, distintos NHF em cepas clínicas, resistentes e sensíveis a FCZ, e, como notado também em nosso trabalho, relataram maior MIC de FCZ nas subpopulações hFCZ em relação ao da isolado parental.

Ainda que a emergência de resistência a FCZ, bem como, o surgimento de subpopulações altamente heterorresistentes sejam atribuídos à exposição prévia ao FCZ, os mecanismos moleculares desses dois tipos de resistência parecem distintos (YAMAZUMI et al., 2003; SIONOV et al., 2009; CHEONG e MCCORMACK, 2013). Células das populações heterorresistentes apresentaram aneuploidia, revelada pela duplicação de distintos cromossomos que contém alguns genes relacionados à biossíntese de ergosterol, como por exemplo o cromossomo 1, onde está situado o gene ERG11 e o ERG4 (SIONOV et al., 2010, 2012). Este mecanismo foi comprovado em nosso estudo, pela primeira vez em isolados clínicos brasileiros, pela demonstração de duplicação principalmente do cromossomo 1 em subpopulação heterorresistente dos isolados em comparação com a população original.

A estratégia fúngica do aumento de bombas de expulsão de FCZ em populações heterorresistentes também foi sugerida em estudos prévios (SIONOV et al., 2012; CHANG et al., 2018), tendo sido comprovada neste estudo através dos testes utilizando rodamina 6G como marcador por citometria de fluxo. Em *C. neoformans*, este marcador é o único substrato semelhante ao FCZ descrito para as bombas de efluxo ABC CnAFR1 e CnMDR1 e a

diminuição da sua fluorescência indica o aumento da expressão destas bombas na membrana celular (POSTERARO et al., 2003; LAMPING et al., 2007; CANNON et al., 2016). Observamos neste trabalho que a maioria das subpopulações hFCZ apresentaram menor fluorescência do marcador rodamina 6G, sugerindo que há maior funcionamento das bombas de efluxo nestas células, em comparação com as populações de células originais,

Seguindo o objetivo de ampliar o conhecimento da natureza do fenômeno de heterorresistência e investigar sua dimensão em isolados brasileiros, foram analisadas também alterações morfológicas nas subpopulações heterorresistentes e comparadas com aquelas observadas na cepa parental. De fato, pode-se confirmar que estas células apresentam morfologias distintas em relação às células parentais, tais como: células maiores e em filamentação, confirmando, assim, achados de outros autores (SIONOV et al., 2010; ALTAMIRANO et al., 2018).

Células heterorresistentes possuem, também, alteração na composição da membrana celular, especificamente, no conteúdo de ergosterol, que é um esterol essencial para manter a permeabilidade e fluidez da membrana (ALTAMIRANO et al., 2018). O FCZ inibe a enzima 14 α -demetilase, codificada pelo *ERG11*. A enzima é responsável por converter lanosterol em ergosterol e sua inibição impede, portanto, a biossíntese do ergosterol na membrana (VANDEN BOSSCHE, 1985). As células de subpopulações heterorresistentes possuem menor concentração de ergosterol e maior de eburicol e obtusifoliona (SIONOV et al., 2009, 2012), ambos já relacionados com isolados tolerantes ao FCZ (VENKATESWARLU et al., 1997).

É incerta, até o momento, a influência do ergosterol, e de outros esteróis, na manutenção de células das subpopulações heterorresistentes a FCZ e seu impacto no curso infeccioso da criptococose. Cepas com alto NHF estão relacionadas à maior virulência em modelo murinho, independente da espécie (SIONOV et al., 2009; VARMA e KWON-CHUNG, 2010), o que indica que estas subpopulações podem ser importantes preditores da evolução clínica da doença. Além disso, recuperação de colônias hFCZ durante monoterapia da criptococose *in vitro* (SIONOV et al., 2013) pode ser um indício que estas células são selecionadas, ou desenvolvidas, na adaptação à altas concentrações de FCZ. Esse fato induz à suposição de que a heterorresistência pode ocorrer *in vivo*, sobretudo durante a fase da terapia de manutenção com FCZ. Recentemente, estudo na Argentina sugeriu que em pacientes com falha terapêutica com FCZ e para os quais o teste de MIC não indicou resistência da cepa infectante, o teste de NHF poderia ser levado em consideração, para orientação do tratamento (ARECHAVALA et al., 2018).

Os dados de NHF e mortalidade não permitiram definir associação com evolução clínica. De outro modo, recentemente, um estudo na Argentina sugeriu que, em pacientes com falha terapêutica com FCZ e para os quais o teste de MIC não indicou resistência da cepa infectante, o teste de NHF pode ser levado em consideração, para orientação do tratamento (ARECHAVALA et al., 2018). Futuros estudos poderão dar melhor dimensão do valor do teste de heterorresistência na conduta clínica. Desde que, os resultados obtidos pelos métodos não clássicos de determinação da suscetibilidade não têm correlação com os obtidos por métodos de MIC, eles podem contribuir para melhor dimensão da ocorrência de resistência a antifúngicos nos agentes da criptococose e sua relevância clínica.

A falência clínica em meningite criptocócica, em regra, ocorre dentro da fase de indução com AMB e, certamente, as manifestações clínicas são condições determinantes para tal, mas fatores microbiológicos relevantes devem ser melhores investigados para dimensionar o seu valor prognóstico. A baixa suscetibilidade da cepa infectante à AMB, pode estar relacionada à tolerância ao fármaco, ou seja, a capacidade do fungo de se manter vivo mesmo em contato com o fármaco. Para tanto, mecanismos de resistência devem ser analisados para que possam elucidar os motivos de sobrevida do agente mesmo em concentrações acima do MIC, como por exemplo produtos que possam amenizar a ação oxidativa do fármaco e ainda modificações na expressão genica que são estimuladas mantidas apenas em condições adversas para o fungo e que favoreçam sua manutenção no hospedeiro (RODERO et al., 2000a; CÓRDOBA et al., 2016).

Dentre as variáveis clínicas relatadas, as manifestações que estiveram associadas ao óbito foram convulsões, confusão mental e estado torporoso, e são condizentes com a literatura (BICANIC e HARRISON, 2004; PAPPALARDO et al., 2007; MORA et al., 2012). Para MORA et al., 2012, *status* mental alterado e convulsões estiveram associados à má evolução clínica em pacientes com criptococose de sistema nervoso central e disseminada. De modo semelhante, CHEN et al., 2012 observaram que a presença de alterações neurológicas, dentre elas papiledema, atrofia do nervo ótico e convulsões são fatores de risco para o óbito e/ou a ocorrência de sequelas neurológicas em até 12 meses. Convulsões (OR=2,2; IC95%=1,2-3,9; $p=0,007$) e *status* mental alterado (OR=4,8; IC95% 2,9-8; $p < 0,001$), também estiveram associados com o óbito de pacientes com meningite criptocócica, em até 2 semanas (JARVIS et al., 2014). A infecção pelo HIV também pode ser um fator contribuinte para alteração mental, como sugerido por CHAN et al. (2014) que observaram diferença significativa desta variável entre pacientes HIV positivos e negativos.

Danos neurológicos decorrentes da infecção podem ocorrer devido a fatores como o aumento da pressão intracraniana e a presença de criptococomas que pode levar a danos cerebrais e nervos cranianos, deficiência nutricional devido à perda de peso, cegueira dentre outros (LEITE et al., 2004; KAMBUGU et al., 2008; BICANIC et al., 2009; CHAU et al., 2010; PANACKAL et al., 2017; SRIVANITCHAPOOM et al., 2018). Além disso, o tempo de infecção pelo HIV leva ao aumento da inflamação no tecido cerebral, o que pode aumentar o risco de danos neurocognitivos (ZAYYAD e SPUDICH, 2015). Dificuldade de locomoção, coordenação motora, raciocínio, comunicação verbal, memorização, são os principais déficits cognitivos em pacientes HIV com criptococose (NAKASUJJA et al., 2010; CARLSON et al., 2014; MONTGOMERY et al., 2017). No entanto, muitos destes agravos são recuperados em decorrência da manutenção da terapia da criptococose e iniciação da terapia antiretroviral, levando à melhora das funções neurocognitivas depois de certo período de tratamento (CARLSON et al., 2014; MONTGOMERY et al., 2017). Complicações neurocognitivas e sequelas decorrentes da neurocriptococose não puderam ser avaliadas neste trabalho devido à impossibilidade de obtenção destas informações em todos os prontuários. No entanto, é ressaltada a importância de monitorar estes agravos durante, e após, a hospitalização uma vez que recidivas da criptococose e falhas na terapia antirretroviral podem resultar dos efeitos destes danos na adesão aos tratamentos. Além disso, apatia e outros sintomas de depressão são descritos em pacientes com tais complicações (NAKASUJJA et al., 2010; CARLSON et al., 2014; MONTGOMERY et al., 2017).

A análise múltipla revelou importantes variáveis já na primeira semana de internação, as quais são capazes de prever o óbito com 91,64%, sendo elas: idade, contagem de leveduras no LCR, e a variável composta formada pelas variáveis hipertensão arterial sistêmica e diagnóstico de edema cerebral e dilatação ventricular por TC. A carga fúngica do 1D, medida pela contagem de leveduras no LCR, mostrou ser um ótimo indicador para predição de óbito e do desfecho composto analisado. Esta variável, facilmente medida no laboratório, foi consistente como preditor independente dos desfechos analisado. Outros estudos também mostraram esta variável associada à falha terapêutica e ao óbito (PITISUTTITHUM et al., 2001; BROUWER et al., 2004; DROMER et al., 2007; MORA et al., 2012; VIDAL et al., 2012; JARVIS et al., 2014). A presença de alto número de leveduras pode contribuir no aumento da pressão intracraniana, sendo um mecanismo proposto à obstrução mecânica do fluxo de LCR (BICANIC et al., 2009; LOYSE et al., 2010). Provavelmente, a presença de cápsulas mucopolissacarídica espessas e de células gigantes de *Cryptococcus* spp. também contribuam para o aumento da pressão intracraniana

(ROBERTSON et al., 2014; BOUKLAS e FRIES, 2015). Embora não tenha apresentado diferença significativa entre o aumento da pressão intracraniana e óbito neste estudo, foi observada uma tendência de maior número de casos desta variável em relação ao óbito, como relatada na literatura (LEE et al., 2011; BRIZENDINE et al., 2013; ROLFES et al., 2014; WHO, 2018). Provavelmente devido ao tamanho da amostra, não foi possível estimar com precisão esta associação. A análise de sobrevida por curvas de Kaplan-Meier indicou que estas variáveis foram preditores consistentes do tempo até o óbito, mesmo quando ajustadas. A variável de hipertensão arterial sistêmica apresentou forte associação. Embora até o momento não exista na literatura disponível informação sobre a associação desta variável com a gravidade da neurocriptococose, ela deve agir sobre outros mecanismos nesta população. O modelo de regressão de Cox indicou que as variáveis analisadas mantiveram as associações, mesmo após a exclusão das observações influentes e *outliers*. Já na análise associada ao desfecho composto, as variáveis associadas foram: contagem de leveduras no LCR, cultura de *Cryptococcus* spp. no sangue e diagnóstico de neurotoxoplasmose. Todas, do mesmo modo, confirmadas pelos modelos de sobrevida.

A idade apresentou associação significativa com o óbito hospitalar, resultado observado também na análise múltipla. LEE et al., 2012 observaram que, além da idade estar associada com falha da terapia da criptococose e óbito, valor acima de 60 anos foi fator preditivo independente de mau prognóstico (OR=4,1; IC95%=1,1-14,5; $p<0.05$) e CHAU et al., (2010) E TSENG et al., (2013), atribuíram idade maior de 60 anos como fator de risco para o óbito enquanto que JARVIS et al., (2014) observou idade acima de 50 anos independentemente associada ao óbito em até 2 semanas (OR=3,9; IC95%=1,4-11,1; $p=0,009$). Além de ser consistente com o desfecho, sugerimos que variável idade constitui um gradiente biológico, uma vez que o aumento dos anos esteve associado ao aumento da *Odds* do óbito.

A variável de disseminação da doença, verificado em 20% dos pacientes e identificada pela cultura em sítios extraneurais, esteve associada ao óbito e ao desfecho composto. Esta variável é reconhecidamente um indicador de gravidade e a presença de *Cryptococcus* spp. no sangue, como verificado na análise múltipla, confirmam que esta medida pode indicar gravidade e má evolução clínica (LIECHTY et al., 2007; GOVENDER et al., 2011; BRIZENDINE et al., 2013; TSENG et al., 2013).

A internação em UTI esteve associada de forma independente ao desfecho de óbito hospitalar. No entanto, considerou-se indicador de fator de risco para o óbito, uma vez que o encaminhamento dos pacientes para tal unidade indica agravamento da doença, e

consequentemente, maior probabilidade de ir à óbito. Logo, por esta variável agir como um indicador de gravidade da doença, ela foi incluída no desfecho composto. De modo semelhante, A dosagem de ureia pode ser um potencial preditor de prognóstico uma vez que o nível maior de 40mg/dL apresentou associação com o óbito já no 1D. Esta variável foi categorizada por apresentar estabilização da OR no decil referente a dosagem de 40mg/dL, com isto observamos que 50% dos indivíduos com ureia sérica acima deste valor foram a óbito, enquanto que apenas 19% dos pacientes com níveis abaixo de 40 mg/dL apresentaram este desfecho. A ureia no 14D também apresentou associação com o óbito, apoiando sua provável função como indicador de evolução clínica, além de complicações da saúde do paciente, que podem ser decorrentes do uso prolongado da AMB. Entretanto, na análise múltipla, dosagem de ureia do 1D acarretou na diminuição das associações das outras variáveis, além de perderem significância. Estes resultados indicam que esta variável pode agir como um indicador de dano nefrológico, ou mediador de fator de risco para a morte durante a hospitalização, que podem ser decorrentes de outros fatores, por exemplo, do uso prolongado da AMB.

A respeito da terapia de indução, todos os pacientes foram tratados com AMB e, de acordo com as recomendações, a terapia combinada é a mais apropriada para meningite criptocócica (WHO, 2018). Neste estudo, a terapia combinada foi administrada em quase a totalidade dos pacientes (97,8%) sendo que, devido à disponibilidade parcial da 5FC no hospital, este fármaco foi dado à pouco mais da metade deles (57,5%). Terapia combinada com FCZ ocorreu em menor proporção (47%). O regime de tratamento não foi associado aos desfechos, indicando a multiplicidade de fatores intervenientes para isso ou equivalência da efetividade dos esquemas terapêuticos nesta população.

A contagem de linfócitos CD4 abaixo de 200 células/mm³ ocorreu em 81,25% dos pacientes e não foi associado a má evolução clínica, no entanto, sabe-se que quando uma variável apresenta baixa variabilidade, ou valores predominantemente reduzidos, como neste caso, perde-se a capacidade e discriminação, o que poderia explicar a falta de associação desta variável em nosso estudo. DING et al., (2017) observaram associação entre contagem de linfócitos CD4 abaixo de 400 células/mm³ e a disseminação da criptococose (OR=23,3; p=0,005). A contagem de linfócitos CD4 abaixo de 200 células/mm³ apresenta elevado risco de mortalidade e de disseminação da criptococose e o uso profilático de FCZ é fortemente recomendado, em determinados cenários epidemiológicos, mesmo quando o teste para detecção do antígeno fúngico não é realizado (LIECHTY et al., 2007; GOVENDER et al., 2011; FORD et al., 2018; WHO, 2018).

A presença de antígeno de *Cryptococcus* spp. no LCR não foi associada aos desfechos. De acordo com a WHO (2018), a dosagem de antígeno, no soro ou LCR, não pode ser considerado fator preditivo para falha no tratamento ou recidiva da criptococose. TSENG et al., (2013) avaliaram fatores de risco associado com a mortalidade em 195 pacientes com criptococose em Taiwan, nas formas de meningoencefalite, pulmonar e disseminada e observou que a dosagem dos níveis de antígeno e presença de cirrose hepática foram preditores independentes de mortalidade. Além disso, BROUWER et al., (2005) observaram correlação entre títulos de antígeno e cultura positiva de LCR, propondo ambos podem ser capazes de prever o óbito às 2 e às 10 semanas de internação. A dosagem do antígeno, ao possuir forte correlação com cultura quantitativa (SCRIVEN et al., 2016), reflete carga fúngica inicial, podendo ser uma ferramenta a ser utilizada também durante para controle da terapia (BROUWER et al., 2005; BICANIC et al., 2009; DYAL et al., 2016).

De acordo com os modelos utilizados, observamos que importantes fatores clínicos determinados nos primeiros dias de internação foram capazes de predizer o prognóstico da criptococose numa população predominantemente de portadores do vírus HIV. Assim, um modelo simples composto por variáveis potencialmente disponíveis nos primeiros dias de internação, permitiu predizer o óbito com alta acurácia. Além disso, as associações se mantiveram consistentes quando avaliadas nas análises de sobrevida. Dentre as variáveis, a contagem de leveduras no primeiro dia de internação mostrou ser preditor de óbito e de gravidade, salientando sua importância no prognóstico. No entanto, para confirmação destes resultados, é necessário avaliar estas variáveis em outras populações.

5.1 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Por se tratar de um estudo retrospectivo, uma das limitações desta pesquisa foi a falta de registro de algumas informações nos prontuários. Além disso, o estudo de isolados dos pacientes que recidivaram poderiam fornecer dados associados à evolução clínica, tais como a emergência de resistência aos antifúngicos, ou ocorrência de infecção por um outro genótipo, que talvez permitissem o encontro de associação com algum dos desfechos. O tamanho da amostra também foi um fator limitante que pode ter influenciado nas associações devido, por exemplo, à medida de Intervalo de Confiança das variáveis “HAS e TC que apresentou valores bem amplos. Apesar destas limitações, foram encontradas associações consistentes

com as descritas na literatura e, mesmo aquelas não relatadas anteriormente, apresentaram resultados consistentes de acordo com os modelos avaliados. As associações foram mantidas em todos os modelos e estiverem associados quanto estimamos OR, a OR ajustada na regressão logística e nos modelos de sobrevida, mesmo após a exclusão das observações com valores extremos. Isto indica que estes preditores não apenas estão associados com a frequência, mas também com velocidade de ocorrência do desfecho. No entanto, é necessário avaliar estas variáveis em estudos com algumas modificações, para a confirmação destes achados.

Espera-se as variáveis preditoras identificadas neste estudo, permitam identificar os casos com maior potencial de óbito e que necessitam da otimização dos recursos terapêuticos

6 CONCLUSÕES

Foi observado que isolados clínicos do complexo *C. neoformans/C. gattii* apresentaram *in vitro* pouca suscetibilidade à ação fungicida da AMB, bem como apresentam altos níveis de heterorresistência ao FCZ. No entanto, nenhum dos indicadores de perfil de suscetibilidade aos antifúngicos, como MIC, NHF e atividade fungicida de AMB estiveram significativamente associados à falha terapêutica ou a recidiva da criptococose no grupo de pacientes analisados.

As técnicas moleculares e a caracterização de isolados de acordo com a suscetibilidade aos antifúngicos permitiu descrever fenômenos de aumento de expressão de DNA e de bombas de efluxo já descritos na literatura e que estariam associados com o desenvolvimento de isolados resistentes.

De acordo com os modelos utilizados, observamos que importantes fatores clínicos, determinados nos primeiros dias de internação foram capazes de predizer o prognóstico da neurocriptococose em pacientes imunossuprimidos, sobretudo portadores do vírus HIV, resultado confirmado nas análises de sobrevida. Dentre as variáveis, a contagem de leveduras no primeiro dia de internação mostrou ser um bom indicador para predição de óbito e do desfecho composto, salientando sua importância no prognóstico.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUDELO, C. A. et al. Response to Therapy in Patients with Cryptococcosis and AIDS: Association with in Vitro Susceptibility to Fluconazole. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 32, n. 4, p. 214–220, out. 2015.

AGUIAR, P. A. D. F. de et al. The Epidemiology of Cryptococcosis and the Characterization of *Cryptococcus neoformans* Isolated in a Brazilian University Hospital. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, n. 0, 2017.

ALLER, A. I. et al. Correlation of Fluconazole MICs with Clinical Outcome in Cryptococcal Infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 6, p. 1544–1548, 6 jan. 2000.

ALTAMIRANO, S. et al. Fluconazole-Induced Ploidy Change in *Cryptococcus neoformans* Results from the Uncoupling of Cell Growth and Nuclear Division. **mSphere**, v. 2, n. 3, 28 jun. 2017.

ALTAMIRANO, S.; SIMMONS, C.; KOZUBOWSKI, L. Colony and Single Cell Level Analysis of the Heterogeneous Response of *Cryptococcus neoformans* to Fluconazole. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, 19 jun. 2018.

ALVES, S. H. et al. Development of Secondary Resistance to Fluconazole in *Cryptococcus neoformans* Isolated from a Patient with AIDS. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 39, n. 6, p. 359–362, nov. 1997.

AMARAL, D. M. do et al. Disseminated Cryptococcosis Manifested as a Single Tumor in an Immunocompetent Patient, Similar to the Cutaneous Primary Forms. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 91, n. 5 suppl 1, p. 29–31, out. 2016.

ANDERSON, T. M. et al. Amphotericin Forms an Extramembranous and Fungicidal Sterol Sponge. **Nature Chemical Biology**, v. 10, n. 5, p. 400–406, maio 2014.

ANDRADE-SILVA, L. et al. Susceptibility Profile of Clinical and Environmental Isolates of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Medical Mycology**, v. 51, n. 6, p. 635–640, ago. 2013.

ARECHAVALA, A. et al. Cryptococcosis in an Infectious Diseases Hospital of Buenos Aires, Argentina. Revision of 2041 Cases: Diagnosis, Clinical Features and Therapeutics. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 35, n. 1, p. 1–10, jan. 2018.

ARENDRUP, M. C. et al. EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 7.3. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)p. 21, 2015.

AZAMBUJA, A. Z. de et al. Cryptococcal Meningitis: A Retrospective Cohort of a Brazilian Reference Hospital in the Post-HAART Era of Universal Access. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2018, p. 1–5, 1 ago. 2018.

BAGNIS, C. I.; DERAY, G. Amphotericin B Nephrotoxicity. **Saudi J Kidney Dis Transplant**, v. 13, n. 4, p. 481–491, 2012.

- BARCHIESI, F. et al. Interactions between Triazoles and Amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 9, p. 2435–2441, 1 set. 2000.
- BARONI, F. de A. et al. *Cryptococcus neoformans* Strains Isolated from Church Towers in Rio de Janeiro City, RJ, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 2, p. 71–75, abr. 2006.
- BARRETO DE OLIVEIRA, M. T. et al. *Cryptococcus neoformans* Shows a Remarkable Genotypic Diversity in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1356–1359, 1 mar. 2004.
- BEALE, M. A. et al. Genotypic Diversity Is Associated with Clinical Outcome and Phenotype in Cryptococcal Meningitis across Southern Africa. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 6, p. e0003847, 25 jun. 2015.
- BICANIC, T. et al. Relationship of Cerebrospinal Fluid Pressure, Fungal Burden and Outcome in Patients with Cryptococcal Meningitis Undergoing Serial Lumbar Punctures: **AIDS**, p. 1, mar. 2009.
- BICANIC, T.; HARRISON, T. S. Cryptococcal Meningitis. **British Medical Bulletin**, v. 72, n. 1, p. 99–118, 1 jan. 2004.
- BONGOMIN, F. et al. A Systematic Review of Fluconazole Resistance in Clinical Isolates of *Cryptococcus* Species. **Mycoses**, 14 fev. 2018.
- BOUKLAS, T.; FRIES, B. C. Aging as an Emergent Factor That Contributes to Phenotypic Variation in *Cryptococcus neoformans*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 59–64, maio 2015.
- BRATTON, E. W. et al. Approaches to Antifungal Therapies and Their Effectiveness among Patients with Cryptococcosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 2485–2495, jun. 2013.
- BRIZENDINE, K. D.; BADDLEY, J. W.; PAPPAS, P. G. Predictors of Mortality and Differences in Clinical Features among Patients with Cryptococcosis According to Immune Status. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e60431, 26 mar. 2013.
- BROUWER, A. E. et al. Combination Antifungal Therapies for HIV-Associated Cryptococcal Meningitis: A Randomised Trial. **The Lancet**, v. 363, n. 9423, p. 1764–1767, maio 2004.
- BROUWER, A. E. et al. Baseline Correlation and Comparative Kinetics of Cerebrospinal Fluid Colony-Forming Unit Counts and Antigen Titers in Cryptococcal Meningitis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, n. 4, p. 681–684, 15 ago. 2005.
- BURGESS, D. S.; HASTINGS, R. W. A comparison of dynamic characteristics of fluconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans* using time-kill methodology. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 38, n. 2, p. 87–93, 2000.

BYRNES, E. J. et al. Emergence and Pathogenicity of Highly Virulent *Cryptococcus gattii* Genotypes in the Northwest United States. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 4, p. e1000850, 22 abr. 2010.

BYRNES, E. J. et al. *Cryptococcus gattii*: An Emerging Fungal Pathogen Infecting Humans and Animals. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 11, p. 895–907, out. 2011.

CANNON, R. D. et al. Efflux-Mediated Antifungal Drug Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 2, p. 291–321, 1 abr. 2009.

CANNON, R. D. et al. Targeting Efflux Pumps to Overcome Antifungal Drug Resistance. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 12, p. 1485–1501, ago. 2016.

CARLSON, R. D. et al. Predictors of Neurocognitive Outcomes on Antiretroviral Therapy after Cryptococcal Meningitis: A Prospective Cohort Study. **Metabolic Brain Disease**, v. 29, n. 2, p. 269–279, jun. 2014.

CHAGAS, O. J. **Correlação entre perfil de suscetibilidade aos antifúngicos do cryptococcus spp., com evolução clínica de pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida e neurocriptococose.** Trabalho de Conclusão de Curso (Residência Médica) Instituto de Infectologia Emilio Ribas. p. 96. 2014.

CHAN, M. et al. Clinical and Microbiological Characteristics of Cryptococcosis in Singapore: Predominance of *Cryptococcus neoformans* Compared with *Cryptococcus gattii*. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 110–115, set. 2014.

CHANG, M. et al. Role of Three *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* Efflux Pump Coding Genes in Response to Drug Treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. AAC.01751-17, 29 jan. 2018.

CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S. *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen. **Trends in microbiology**, v. 19, n. 11, p. 564–571, nov. 2011.

CHAU, T. T. et al. A Prospective Descriptive Study of Cryptococcal Meningitis in HIV Uninfected Patients in Vietnam - High Prevalence of *Cryptococcus neoformans* Var Grubii in the Absence of Underlying Disease. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, dez. 2010.

CHAYAKULKEEREE, M.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 20, n. 3, p. 507–544, set. 2006.

CHEN, S. C.-A. et al. Clinical Manifestations of *Cryptococcus gattii* Infection: Determinants of Neurological Sequelae and Death. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 6, p. 789–798, 15 set. 2012.

CHEN, Y.-C. et al. Clinical Features and in Vitro Susceptibilities of Two Varieties of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, p. 9, 2000.

CHENG, P.-Y.; SHAM, A.; KRONSTAD, J. W. *Cryptococcus gattii* Isolates from the British Columbia Cryptococcosis Outbreak Induce Less Protective Inflammation in a Murine Model of Infection than *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 10, p. 4284–4294, 1 out. 2009.

CHEONG, J. W. S.; MCCORMACK, J. Fluconazole Resistance in Cryptococcal Disease: Emerging or Intrinsic? **Medical Mycology**, v. 51, n. 3, p. 261–269, abr. 2013.

CHONG, H. S. et al. In Vitro Susceptibility of the Yeast Pathogen *Cryptococcus* to Fluconazole and Other Azoles Varies with Molecular Genotype. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 11, p. 4115–4120, 1 nov. 2010.

CHOWDHARY, A. et al. In Vitro Antifungal Susceptibility Profiles and Genotypes of 308 Clinical and Environmental Isolates of *Cryptococcus neoformans* Var. Grubii and *Cryptococcus gattii* Serotype B from North-Western India. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 961–967, 1 jul. 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (ed.). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard**. 3rd ed ed. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2008.

COGLIATI, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. **Scientifica**, v. 2013, p. 1–23, 2013.

CORBETT, E. L. et al. Morbidity and Mortality in South African Gold Miners: Impact of Untreated Disease Due to Human Immunodeficiency Virus. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 9, p. 1251–1258, maio 2002.

CÓRDOBA, S. et al. Comparison of Different In Vitro Tests to Detect *Cryptococcus neoformans* Not Susceptible to Amphotericin B. **Mycopathologia**, v. 179, n. 5–6, p. 359–371, jun. 2015.

CÓRDOBA, S. et al. Susceptibility Profile and Epidemiological Cut-off Values of *Cryptococcus neoformans* Species Complex from Argentina. **Mycoses**, v. 59, n. 6, p. 351–356, 1 jun. 2016.

CÓRDOBA, S.; AFELTRA, J.; VITALE, R. G. Evaluation of the in Vitro Activity of Amphotericin B by Time–Kill Curve Methodology against Large and Small Capsulate *C. neoformans* Isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 71, n. 3, p. 260–262, nov. 2011.

COSTA, S. do P. et al. First Isolation of *Cryptococcus gattii* Molecular Type VGII and *Cryptococcus neoformans* Molecular Type VNI from Environmental Sources in the City of Belém, Pará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 662–664, jul. 2009.

COWEN, L. E. et al. Mechanisms of antifungal drug resistance. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 5, n. 7, p. a019752, 2015.

DALHOFF, A.; AMBROSE, P. G.; MOUTON, J. W. A Long Journey from Minimum Inhibitory Concentration Testing to Clinically Predictive Breakpoints: Deterministic and Probabilistic Approaches in Deriving Breakpoints. **Infection**, v. 37, n. 4, p. 296–305, ago. 2009.

DANNAOUI, E. et al. Results Obtained with Various Antifungal Susceptibility Testing Methods Do Not Predict Early Clinical Outcome in Patients with Cryptococcosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 7, p. 2464–2470, 1 jul. 2006.

DELARZE, E.; SANGLARD, D. Defining the Frontiers between Antifungal Resistance, Tolerance and the Concept of Persistence. **Drug Resistance Updates**, v. 23, p. 12–19, nov. 2015.

DENNING, D. W.; HOPE, W. W. Therapy for Fungal Diseases: Opportunities and Priorities. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 195–204, maio 2010.

DICK, J. D.; MERZ, W. G.; SARAL, R. Incidence of Polyene-Resistant Yeasts Recovered from Clinical Specimens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 18, n. 1, p. 158–163, 1 jul. 1980.

DING, J. C. et al. Effect of Severity of Meningitis on Fungicidal Activity of Flucytosine Combined with Fluconazole in a Murine Model of Cryptococcal Meningitis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, p. 6, 1997.

DING, Y. et al. The CD4+ T-Lymphocyte Count Is an Important Predictor for the Prognosis of Cryptococcosis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 36, n. 5, p. 897–904, maio 2017.

DIXIT, A.; CARROLL, S. F.; QURESHI, S. T. *Cryptococcus gattii* : An Emerging Cause of Fungal Disease in North America. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2009, p. 1–13, 2009.

DOMINGUES, C.-S. B.; WALDMAN, E. A. Causes of Death among People Living with AIDS in the Pre- and Post-HAART Eras in the City of São Paulo, Brazil. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. e114661, 11 dez. 2014.

DROMER, F. et al. Epidemiology of Cryptococcosis in France: A 9-Year Survey (1985–1993). **Clinical Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 82–90, 1 jul. 1996.

DROMER, F. et al. Determinants of Disease Presentation and Outcome during Cryptococcosis: The CryptoA/D Study. **PLoS Medicine**, v. 4, n. 2, p. e21, 6 fev. 2007.

DYAL, J. et al. Reproducibility of CSF Quantitative Culture Methods for Estimating Rate of Clearance in Cryptococcal Meningitis. **Medical Mycology**, v. 54, n. 4, p. 361–369, 1 maio 2016.

EISENMAN, H. C. et al. Microstructure of Cell Wall-Associated Melanin in the Human Pathogenic Fungus *Cryptococcus neoformans* [†]. **Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 3683–3693, mar. 2005.

ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Journal of clinical microbiology**, v. 28, n. 7, p. 1642–1644, 1990.

ERNST, E. J. Susceptibility Testing Methods of Antifungal Agents. In: ERNST, E. J.; ROGERS, P. D. (Ed.). **Antifungal Agents**. New Jersey: Humana Press, 2005. 118p. 003–012.

ESPINEL-INGROFF, A. Etest for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 19, n. 4, p. 217–220, ago. 1994.

ESPINEL-INGROFF, A. Novel Antifungal Agents, Targets or Therapeutic Strategies for the Treatment of Invasive Fungal Diseases: A Review of the Literature (2005-2009). **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 1, p. 15–22, mar. 2009.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* Species Complex: An International Study of Wild-Type Susceptibility Endpoint Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Amphotericin B and Flucytosine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 3107–3113, 1 jun. 2012a.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. *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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 5898–5906, 1 nov. 2012b.

FELICIANO, L. M. et al. Heteroresistance to Fluconazol in Clinical and Environmental Brazilian Strains of *Cryptococcus neoformans*/C. *gattii* Species Complex. **Current Fungal Infection Reports**, v. 11, n. 4, p. 190–196, dez. 2017.

FERREIRA, G. F. et al. Heteroresistance to Itraconazole Alters the Morphology and Increases the Virulence of *Cryptococcus gattii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4600–4609, ago. 2015.

FERREIRA, G. F.; SANTOS, D. A. Heteroresistance and Fungi. **Mycoses**, v. 60, n. 9, p. 562–568, set. 2017.

FIRACATIVE, C. et al. The Status of Cryptococcosis in Latin America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, 5 abr. 2018.

FORD, N. et al. CD4 Cell Count Threshold for Cryptococcal Antigen Screening of HIV-Infected Individuals: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 66, n. suppl_2, p. S152–S159, 4 mar. 2018.

FORTES, S. T. et al. First Isolation of *Cryptococcus neoformans* Var. *gattii* from a Native Jungle Tree in the Brazilian Amazon Rainforest. **Mycoses**, v. 44, n. 5, p. 137–140, jul. 2001.

FRANZOT, S. P.; SALKIN, I. F.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* Var. *Grubii*: Separate Varietal Status for *Cryptococcus neoformans* Serotype A Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 838–840, mar. 1999.

FRASER, J. A. et al. Recapitulation of the Sexual Cycle of the Primary Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans* Var. *gattii*: Implications for an Outbreak on Vancouver Island, Canada. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 5, p. 1036–1045, out. 2003.

FRASER, J. A. et al. Same-Sex Mating and the Origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* Outbreak. v. 437, p. 5, 2005.

FREIJ, J. B.; FREIJ, B. J. The Earliest Account of Human Cryptococcosis (Busse–Buschke Disease) in a Woman with Chronic Osteomyelitis of the Tibia: **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 34, n. 11, p. 1278, nov. 2015.

FREIRE, A. K. L. et al. Molecular Characterisation of the Causative Agents of Cryptococcosis in Patients of a Tertiary Healthcare Facility in the State of Amazonas-Brazil: Cryptococcosis in the State of Amazonas-Brazil. **Mycoses**, v. 55, n. 3, p. e145–e150, maio 2012.

GAGO, S. et al. Molecular Identification, Antifungal Resistance and Virulence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus Deneoformans* Isolated in Seville, Spain. **Mycoses**, v. 60, n. 1, p. 40–50, 2017.

GALANIS, E. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999–2007. **Emerging Infectious Diseases**, fev. 2010.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. **CLIN. MICROBIOL. REV.**, p. 18, 1999.

GOMEZ-LOPEZ, A. et al. In Vitro Susceptibility of *Cryptococcus gattii* Clinical Isolates. **Clin Microbiol Infect.**, v. 14, n. 7, p. 4, 2008.

GOVENDER, N. P. et al. Trends in Antifungal Drug Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* Isolates Obtained through Population-Based Surveillance in South Africa in 2002-2003 and 2007-2008. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 2606–2611, jun. 2011.

HAGEN, F. et al. In Vitro Antifungal Susceptibilities and Amplified Fragment Length Polymorphism Genotyping of a Worldwide Collection of 350 Clinical, Veterinary, and Environmental *Cryptococcus gattii* Isolates. **ANTIMICROB. AGENTS CHEMOTHER.**, v. 54, p. 7, 2010.

HAGEN, F. et al. Recognition of Seven Species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* Species Complex. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 16–48, maio 2015.

HARRIS, J. R. et al. *Cryptococcus gattii* in the United States: Clinical Aspects of Infection With an Emerging Pathogen. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 12, p. 8, 2011.

HOANG, L. M. N. *Cryptococcus neoformans* Infections at Vancouver Hospital and Health Sciences Centre (1997-2002): Epidemiology, Microbiology and Histopathology. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. 9, p. 935–940, 1 set. 2004.

HOFFMANN, J. P. **Regression models for categorical, count, and related variables : an applied approach**. Oakland: University of California Press, 2016.

IKEDA, R. et al. Effects of Melanin upon Susceptibility of *Cryptococcus* to Antifungals. **Microbiology and Immunology**, v. 47, n. 4, p. 271–277, 2003.

IQBAL, N. et al. Correlation of Genotype and In Vitro Susceptibilities of *Cryptococcus gattii* Strains from the Pacific Northwest of the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 539–544, 1 fev. 2010.

JAIN, N. et al. Molecular Epidemiology of Clinical *Cryptococcus neoformans* Strains from India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5733–5742, 1 nov. 2005.

JARVIS, J. N. et al. Adult Meningitis in a Setting of High HIV and TB Prevalence: Findings from 4961 Suspected Cases. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, dez. 2010.

JARVIS, J. N. et al. Determinants of Mortality in a Combined Cohort of 501 Patients With HIV-Associated Cryptococcal Meningitis: Implications for Improving Outcomes. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. 5, p. 736–745, 1 mar. 2014.

JOSEPH-HORNE, T. et al. Cross-Resistance to Polyene and Azole Drugs in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 7, p. 1526–1529, 1 jul. 1995.

KAMBUGU, A. et al. Outcomes of Cryptococcal Meningitis in Uganda Before and After the Availability of Highly Active Antiretroviral Therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 11, p. 1694–1701, jun. 2008.

KANTARCIOGLU, A. S. K.; YUCEL, A. A Flucytosine-Resistant *Cryptococcus neoformans* (Serotype D) Strain Isolated in Turkey from Cutaneous Lesions. **Medical Mycology**, v. 40, p. 519–523, 2002.

KELLY, S. L. et al. Resistance to Amphotericin B Associated with Defective Sterol $\Delta^{8\rightarrow7}$ Isomerase in a *Cryptococcus neoformans* Strain from an AIDS Patient. **FEMS Microbiology Letters**, v. 122, n. 1–2, p. 39–42, set. 1994.

KIDD, S. E. et al. A Rare Genotype of *Cryptococcus gattii* Caused the Cryptococcosis Outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 49, p. 17258–17263, 7 dez. 2004.

KLEPSER, M. E. et al. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 1207–1212, 1998.

KRESS, Y.; FELDMESSER, M.; CASADEVALL, A. Dynamic Changes in the Morphology of *Cryptococcus neoformans* during Murine Pulmonary Infection. **Microbiology**, v. 147, n. 8, p. 2355–2365, 1 ago. 2001.

KURTZMAN, C.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts**. 5 Edition ed. Oxford, UK: Elsevier Science, 2011.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. EPIDEMIOLOGIC DIFFERENCES BETWEEN THE TWO VARIETIES OF CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS1. **American Journal of Epidemiology**, v. 120, n. 1, p. 123–130, jul. 1984.

KWON-CHUNG, K. J.; VARMA, A. Do Major Species Concepts Support One, Two or More Species within *Cryptococcus neoformans* ? **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 4, p. 574–587, jun. 2006.

LAMPING, E. et al. Characterization of Three Classes of Membrane Proteins Involved in Fungal Azole Resistance by Functional Hyperexpression in *Saccharomyces Cerevisiae*. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 7, p. 1150–1165, jul. 2007.

LAZERA, M. S. et al. *Cryptococcus neoformans* Var. *gattii* — Evidence for a Natural Habitat Related to Decaying Wood in a Pottery Tree Hollow. **Medical Mycology**, p. 4, 1998.

LAZERA, M. S.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M. M. Isolation of Both Varieties of *Cryptococcus neoformans* from Saprophytic Sources in the City of Rio de Janeiro, Brazil. **Medical Mycology**, v. 31, n. 6, p. 449–454, jan. 1993.

LEE, C.-H. et al. Correlation of anti-fungal susceptibility with clinical outcomes in patients with cryptococcal meningitis. **BMC infectious diseases**, v. 12, n. 1, p. 361, 2012.

LEE, Y.-C. et al. Comparisons of Clinical Features and Mortality of Cryptococcal Meningitis between Patients with and without Human Immunodeficiency Virus Infection. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 44, n. 5, p. 338–345, out. 2011.

LEITE, A. G. B. et al. Cerebral Infarction Related to Cryptococcal Meningitis in an HIV-Infected Patient: Case Report and Literature Review. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 2, abr. 2004.

LIECHTY, C. A. et al. Asymptomatic Serum Cryptococcal Antigenemia and Early Mortality during Antiretroviral Therapy in Rural Uganda. **Tropical Medicine & International Health**, v. 12, n. 8, p. 929–935, 2007.

LIMPER, A. H. et al. An Official American Thoracic Society Statement: Treatment of Fungal Infections in Adult Pulmonary and Critical Care Patients. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 183, n. 1, p. 96–128, jan. 2011.

LIN, X.; HEITMAN, J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 69–105, out. 2006.

LITVINTSEVA, A. P. et al. Evidence That the Human Pathogenic Fungus *Cryptococcus neoformans* Var. Grubii May Have Evolved in Africa. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. e19688, 11 maio 2011.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

LOCKHART, S. R. et al. *Cryptococcus gattii* in the United States: Genotypic Diversity of Human and Veterinary Isolates. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e74737, 3 set. 2013.

LOYSE, A. et al. Histopathology of the Arachnoid Granulations and Brain in HIV-Associated Cryptococcal Meningitis: Correlation with Cerebrospinal Fluid Pressure. **AIDS**, v. 24, n. 3, p. 405–410, jan. 2010.

LOZANO-CHIU, M. et al. Detection of Resistance to Amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* Clinical Isolates: Performances of Three Different Media Assessed by Using E-Test and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A Methodologies. **J. CLIN. MICROBIOL.**, v. 36, p. 6, 1998.

MACDOUGALL, L. et al. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and Detection in the Pacific Northwest, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 9, 2007.

MARTHO, K. F. C. et al. Amino Acid Permeases and Virulence in *Cryptococcus neoformans*. **PLOS ONE**, v. 11, n. 10, p. e0163919, 3 out. 2016.

MARTINS, L. M. S. et al. Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as Agents of Endemic Cryptococcosis in Teresina, Piauí (Northeastern Brazil). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 6, p. 725–730, set. 2011.

MASCARENHAS-BATISTA, A. V.; MASCARENHAS SOUZA, N.; SACRAMENTO, E. Fatores Prognósticos Na Meningite Criptocócica Em Hospital De Referência Para Doenças Infecciosas. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 37, p. 68, 29 maio 2013.

MATOS, C. S. et al. Microbiological Characteristics of Clinical Isolates of *Cryptococcus* Spp. in Bahia, Brazil: Molecular Types and Antifungal Susceptibilities. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, n. 7, p. 1647–1652, jul. 2012.

MESA-ARANGO, A. C. et al. 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**, v. 58, n. 11, p. 6627–6638, nov. 2014.

MEYER, W. et al. Molecular Typing of Global Isolates Of *Cryptococcus neoformans* Var. *neoformans* by Polymerase Chain Reaction Fingerprinting and Randomly Amplified Polymorphic DNA — a Pilot Study to Standardize Techniques on Which to Base a Detailed Epidemiological Survey. **Electrophoresis**, v. 20, n. 8, p. 1790–1799, 1 jan. 1999.

MEYER, W. et al. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerging infectious diseases**, v. 9, n. 2, p. 189, 2003.

MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the Era of AIDS 100 Years after the Discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 515–548, 1995.

MONDON, P. et al. Heteroresistance to Fluconazole and Voriconazole in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 8, p. 1856–1861, 1 ago. 1999.

MONTENEGRO, H.; PAULA, C. R. Environmental Isolation of *Cryptococcus neoformans* Var. *gattii* and *C. neoformans* Var. *neoformans* in the City of São Paulo, Brazil. **Medical Mycology**, p. 6, 2000.

MONTGOMERY, M. P. et al. Neurocognitive Function in HIV-Infected Persons with Asymptomatic Cryptococcal Antigenemia: A Comparison of Three Prospective Cohorts. **BMC Neurology**, v. 17, n. 1, dez. 2017.

MORA, D. J. et al. Clinical, Epidemiological and Outcome Features of Patients with Cryptococcosis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Mycopathologia**, v. 173, n. 5–6, p. 321–327, jun. 2012.

MOREIRA, T. de A. et al. Criptococose: estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 255–258, jun. 2006.

NAKASUJJA, N. et al. Depression Symptoms and Cognitive Function among Individuals with Advanced HIV Infection Initiating HAART in Uganda. p. 7, 2010.

NASRI, H. et al. Retrospective Study of Cryptococcal Meningitis With Elevated Minimum Inhibitory Concentration to Fluconazole in Immunocompromised Patients. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 3, n. 2, p. ofw076, abr. 2016.

NGAMSKULRUNGROJ, P. et al. Global VGIIa Isolates Are of Comparable Virulence to the Major Fatal *Cryptococcus gattii* Vancouver Island Outbreak Genotype. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 2, p. 251–258, fev. 2011.

NGAMSKULRUNGROJ, P. et al. Characterization of the Chromosome 4 Genes That Affect Fluconazole-Induced Disomy Formation in *Cryptococcus neoformans*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e33022, 7 mar. 2012.

NGAMSKULRUNGROJ, P.; MEYER, W. Melanin Production at 37°C Is Linked to the High Virulent *Cryptococcus gattii* Vancouver Island Outbreak Genotype VGIIa. **Australasian Mycologist**, v. 28, p. 9–14, 2009.

NISHIKAWA, M. M. et al. Comparative Antifungal Susceptibility Analyses of *Cryptococcus neoformans* VNI and *Cryptococcus gattii* VGII from the Brazilian Amazon Region by the Etest, Vitek 2, and the Clinical and Laboratory Standards Institute Broth Microdilution Methods. **Medical Mycology**, 17 jan. 2019.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Impact of Melanin on Microbial Virulence and Clinical Resistance to Antimicrobial Compounds. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 11, p. 3519–3528, 1 nov. 2006.

NUNES, J. de O. et al. Cryptococcal Meningitis Epidemiology: 17 Years of Experience in a State of the Brazilian Pantanal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 4, p. 485–492, ago. 2018.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal Agents: Mechanisms of Action. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272–279, jun. 2003.

OLIVEIRA, L. de. **Estudo de características dos agentes de criptococose: genótipos, polimorfismo, melanização e suscetibilidade a antifúngicos**. Dissertação (Mestrado em Ciencias)Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo-PPG-CCD-SES/SP, 114 p, 2015.

OLIVEIRA, L. et al. Time-Kill Curves Studies with Amphotericin B Against *Cryptococcus neoformans*/C. *gattii* Species Complex Clinical Isolates. **Current Fungal Infection Reports**, v. 11, n. 4, p. 158–162, dez. 2017.

OLIVEIRA, R. V. et al. Regional Pattern of the Molecular Types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103(5), p. 455–462, 2008.

PANACKAL, A. A. et al. Spinal Arachnoiditis as a Complication of Cryptococcal Meningoencephalitis in Non-HIV Previously Healthy Adults. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 3, p. 275–283, 1 fev. 2017.

PAPPALARDO, M. C.; PASCHOAL, R. C.; MELHEM, M. S. AIDS-Associated Central Nervous System Cryptococcosis: A Brazilian Case Study. **AIDS**, v. 21, n. 14, p. 1971–1972, set. 2007.

PAPPALARDO, M. C. S. M. et al. Susceptibility of Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* to Amphotericin B Using Time–Kill Methodology. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, n. 2, p. 146–151, jun. 2009.

PARK, B. J. et al. Evaluation of Amphotericin B Interpretive Breakpoints for Candida Bloodstream Isolates by Correlation with Therapeutic Outcome. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1287–1292, 1 abr. 2006.

PARK, B. J. et al. Estimation of the Current Global Burden of Cryptococcal Meningitis among Persons Living with HIV/AIDS: **AIDS**, v. 23, n. 4, p. 525–530, fev. 2009.

PAULA, C. R. et al. *Cryptococcus gattii*: Immunological and Microbiological Study in a Patient with Neurocryptococcosis. **JMM Case Reports**, v. 2, n. 5, 9 out. 2015.

PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; ESPINEL-INGROFF, A. Antifungal Drug Resistance Mechanisms. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 7, n. 4, p. 453–460, maio 2009.

PERFECT, J. R. et al. Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 3, p. 291–322, fev. 2010.

PERFECT, J. R. The Antifungal Pipeline: A Reality Check. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 9, p. 603–616, 12 maio 2017.

PERFECT, J. R.; COX, G. M. Drug Resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Drug Resistance Updates**, v. 2, p. 11, 1999.

PERFECT, J. R.; LANG, S. D. R.; DURACK, D. T. Chronic Cryptococcal Meningitis. v. 101, n. 1, p. 18, 1980.

PERFECT, J. R.; MAGEE, B. B.; MAGEE, P. T. Separation of Chromosomes of *Cryptococcus neoformans* by Pulsed Field Gel Electrophoresis. p. 5, [s.d.]

PFALLER, M. et al. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates from Ugandan AIDS patients. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 32, n. 3, p. 191–199, 1998.

PFALLER, M. A. et al. Global Trends in the Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2163–2167, 1 maio 2005.

PFALLER, M. A. et al. Wild-Type MIC Distributions and Epidemiologic Cutoff Values for Fluconazole, Posaconazole, and Voriconazole When Testing *Cryptococcus neoformans* as Determined by the CLSI Broth Microdilution Method. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 71, n. 3, p. 252–259, nov. 2011.

PFALLER, M. A. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1, p. S3–S13, jan. 2012.

- PITISUTTITHUM, P. et al. A Prospective Study of AIDS-Associated Cryptococcal Meningitis in Thailand Treated with High-Dose Amphotericin B. **Journal of Infection**, v. 43, n. 4, p. 226–233, nov. 2001.
- POLACHECK, I.; LEBENS, G. A. Electrophoretic Karyotype of the Pathogenic Yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 135, n. 1, p. 65–71, 1 jan. 1989.
- POLACHECK, I.; PLATT, Y.; ARONOVITCH, J. Catecholamines and Virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 58, p. 2919–2922, 1990.
- POSTERARO, B. et al. Identification and Characterization of a *Cryptococcus neoformans* ATP Binding Cassette (ABC) Transporter-Encoding Gene, CnAFR1, Involved in the Resistance to Fluconazole: ABC Transporter Gene in Azole Resistance of *C. neoformans*. **Molecular Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 357–371, 10 jan. 2003.
- POWDERLY, W. G. Amphotericin B-Resistant Yeast Infection in Severely Immunocompromised Patients. **The American Journal of Medicine**, v. 84, p. 7, 1988.
- PRASAD, R.; RAWAL, M. K. Efflux Pump Proteins in Antifungal Resistance. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, 29 ago. 2014.
- PYRGOS, V. et al. Epidemiology of Cryptococcal Meningitis in the US: 1997–2009. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e56269, 15 fev. 2013.
- RAJASINGHAM, R. et al. Global Burden of Disease of HIV-Associated Cryptococcal Meningitis: An Updated Analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. 873–881, ago. 2017.
- RICHARDSON, M. D.; WARNOCK, D. W. **Fungal infection: diagnosis and management**. Chichester, West Sussex; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2012.
- ROBERTSON, E. J. et al. *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**, v. 209, n. 1, p. 74–82, 1 jan. 2014.
- RODERO, L. et al. Timed-kill curves for *Cryptococcus neoformans* isolated from patients with AIDS. **Medical mycology**, v. 38, n. 3, p. 201–207, 2000a.
- RODERO, L. et al. In Vitro Susceptibility Studies of *Cryptococcus neoformans* Isolated from Patients with No Clinical Response to Amphotericin B Therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, n. 2, p. 239–242, fev. 2000b.
- RODERO, L. et al. G484S Amino Acid Substitution in Lanosterol 14- Demethylase (ERG11) Is Related to Fluconazole Resistance in a Recurrent *Cryptococcus neoformans* Clinical Isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 11, p. 3653–3656, 1 nov. 2003.
- ROLFES, M. A. et al. The Effect of Therapeutic Lumbar Punctures on Acute Mortality From Cryptococcal Meningitis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. 11, p. 1607–1614, 1 dez. 2014.

ROSARIO, I.; ACOSTA, B.; COLOM, F. La paloma y otras aves como reservorio de *Cryptococcus* spp. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, n. 1, p. S13–S18, mar. 2008.

SAGATOVA, A. A. et al. Triazole Resistance Mediated by Mutations of a Conserved Active Site Tyrosine in Fungal Lanosterol 14 α -Demethylase. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, set. 2016.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2006, n. 23, 1 set. 2006.

SANGLARD, D. et al. Multiple Resistance Mechanisms to Azole Antifungals in Yeast Clinical Isolates. **Drug Resistance Updates**, v. 1, n. 4, p. 255–265, jan. 1998.

SANGLARD, D. Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens. **Frontiers in Medicine**, v. 3, 15 mar. 2016.

SANGUINETTI, M. et al. Role of AFR1, an ABC Transporter-Encoding Gene, in the In Vivo Response to Fluconazole and Virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 2, p. 1352–1359, 1 fev. 2006.

SAR, B. Increasing in Vitro Resistance to Fluconazole in *Cryptococcus neoformans* Cambodian Isolates: April 2000 to March 2002. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 563–565, 1 jul. 2004.

SCRIVEN, J. E. et al. Flow Cytometry To Assess Cerebrospinal Fluid Fungal Burden in Cryptococcal Meningitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 802–804, mar. 2016.

SEVERO, C. B.; GAZZONI, A. F.; SEVERO, L. C. Capítulo 3: Criptococose Pulmonar. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 11, p. 1136–1144, nov. 2009.

SILVA, D. C. et al. Susceptibility to Antifungal Agents and Genotypes of Brazilian Clinical and Environmental *Cryptococcus gattii* Strains. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 72, n. 4, p. 332–339, abr. 2012.

SILVA, P. R. da et al. Susceptibility to antifungal agents among *Cryptococcus neoformans* varieties isolated from patients at a university hospital. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 2, p. 158–162, 2008.

SIONOV, E. et al. Heteroresistance to Fluconazole in *Cryptococcus neoformans* Is Intrinsic and Associated with Virulence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 7, p. 2804–2815, 1 jul. 2009.

SIONOV, E. et al. *Cryptococcus neoformans* Overcomes Stress of Azole Drugs by Formation of Disomy in Specific Multiple Chromosomes. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 4, p. e1000848, 1 abr. 2010.

SIONOV, E. et al. Identification of a *Cryptococcus neoformans* Cytochrome P450 Lanosterol 14 α -Demethylase (Erg11) Residue Critical for Differential Susceptibility between Fluconazole/Voriconazole and Itraconazole/Posaconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 3, p. 1162–1169, mar. 2012.

SIONOV, E.; CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Azole Heteroresistance in *Cryptococcus neoformans*: Emergence of Resistant Clones with Chromosomal Disomy in the Mouse Brain during Fluconazole Treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 5127–5130, out. 2013.

SMITH, K. D. et al. Increased Antifungal Drug Resistance in Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* in Uganda. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7197–7204, dez. 2015.

SMITH, R. M. et al. Treatment and Outcomes among Patients with *Cryptococcus gattii* Infections in the United States Pacific Northwest. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e88875, 19 fev. 2014.

SOKOL-ANDERSON, M. et al. Role of Cell Defense against Oxidative Damage in the Resistance of *Candida Albicans* to the Killing Effect of Amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, n. 5, p. 702–705, 1 maio 1988.

SORRELL, T. C.; ELLIS, D. H. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. **Rev Iberoam Micol**, v. 14, p. 42–43, 1997.

SOUTO, A. C. P. et al. 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 Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 8, p. e0004885, 16 ago. 2016.

SRIVANITCHAPOOM, P. et al. Brainstem Dysfunction Heraldng Disseminated Cryptococcosis. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 167, p. 62–64, abr. 2018.

THORNEWELL, S. J.; PEERY, R. B.; SKATRUD, P. L. Cloning and characterization of CneMDR1: a *Cryptococcus neoformans* gene encoding a protein related to multidrug resistance proteins. **Gene**, v. 201, n. 1, p. 21–29, 12 nov. 1997.

TRILLES, L. et al. Correlation of Antifungal Susceptibility and Molecular Type within the *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* Species Complex. **Medical Mycology**, v. 50, n. 3, p. 328–332, abr. 2012.

TSENG, H.-K. et al. Microbiological, Epidemiological, and Clinical Characteristics and Outcomes of Patients with Cryptococcosis in Taiwan, 1997–2010. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61921, 17 abr. 2013.

TURNIDGE, J.; KAHLMETER, G.; KRONVALL, G. Statistical Characterisation of Bacterial Wild-Type MIC Value Distributions and the Determination of Epidemiological Cut-off Values. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 5, p. 418–425, maio 2006.

UPADHYA, R. et al. Global Transcriptome Profile of *Cryptococcus neoformans* during Exposure to Hydrogen Peroxide Induced Oxidative Stress. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e55110, 28 jan. 2013.

VALLE, L. D. HIV Disorders of the Brain; Pathology and Pathogenesis. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, n. 1, p. 718, 2006.

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and Histoplasma Capsulatum Reduces Their Susceptibilities to Amphotericin B and Caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3394–3400, 1 nov. 2002.

VANDEN BOSSCHE, H. Biochemical Targets for Antifungal Azole Derivatives: Hypothesis on the Mode of Action. **Current Topics in Medical Mycology**, v. 1, p. 313–351, 1985.

VANDENBOSSCHE, I. et al. Susceptibility Testing of Fluconazole by the NCCLS Broth Macrodilution Method, E-Test, and Disk Diffusion for Application in the Routine Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 918–921, 1 mar. 2002.

VARMA, A.; KWON-CHUNG, K. J. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to Fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2303–2311, 1 jun. 2010.

VENA, A. et al. Fluconazole Resistance Is Not a Predictor of Poor Outcome in Patients with Cryptococcosis. **Mycoses**, 5 set. 2018.

VENKATESWARLU, K. et al. Fluconazole tolerance in clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 41, n. 4, p. 748–751, 1997.

VERMES, A. Flucytosine: A Review of Its Pharmacology, Clinical Indications, Pharmacokinetics, Toxicity and Drug Interactions. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 171–179, 1 ago. 2000.

VIDAL, J. E. et al. Role of Quantitative CSF Microscopy to Predict Culture Status and Outcome in HIV-Associated Cryptococcal Meningitis in a Brazilian Cohort. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 1, p. 68–73, maio 2012.

VIDAL, J. E. et al. Strategies to Reduce Mortality and Morbidity Due to AIDS-Related Cryptococcal Meningitis in Latin America. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 353–362, maio 2013.

VITALE, R. G.; PASCUCCELLI, V.; AFELTRA, J. Influence of Capsule Size on the in Vitro Activity of Antifungal Agents against Clinical *Cryptococcus neoformans* Var. Grubii Strains. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 384–388, 1 mar. 2012.

VIVIANI, M. A. et al. Molecular Analysis of 311 *Cryptococcus neoformans* Isolates from a 30-Month ECMM Survey of Cryptococcosis in Europe. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 4, p. 614–619, jun. 2006.

WALSH, T. J.; PIZZO, A. Treatment of Systemic Fungal Infections: Recent Progress and Current Problems. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 7, n. 4, p. 460–475, 1 ago. 1988.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* Melanin and Virulence: Mechanism of Action. **INFECTION AND IMMUNITY**, p. 3131–3136, 1995.

WIRTH, F.; AZEVEDO, M. I.; GOLDANI, L. Z. Molecular Types of *Cryptococcus* Species Isolated from Patients with Cryptococcal Meningitis in a Brazilian Tertiary Care Hospital. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, nov. 2018.

WHO. **Guidelines on the diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children: supplement to the 2016 consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection.** Geneva: World Health Organization, 51p, mar. 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

YAMAZUMI, T. et al. Characterization of Heteroresistance to Fluconazole among Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 267–272, 1 jan. 2003.

ZARAGOZA, O. et al. Capsule Enlargement in *Cryptococcus neoformans* Confers Resistance to Oxidative Stress Suggesting a Mechanism for Intracellular Survival. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2043–2057, 2008.

ZAYYAD, Z.; SPUDICH, S. Neuropathogenesis of HIV: From Initial Neuroinvasion to HIV-Associated Neurocognitive Disorder (HAND). **Current HIV/AIDS Reports**, v. 12, n. 1, p. 16–24, mar. 2015.

APENDICE

Ficha dados Clínicos- Estudo ‘Fatores microbiológicos da criptococose e sua importância na carga da doença em pacientes atendidos em um hospital de referência do Estado de São Paulo’- Lidiane de Oliveira

Data ____/____/____

Nome _____ Num. Prontuário _____ Data de nascimento: ____/____/____.

Data de internação: ____/____/____. Gênero: () Masculino () Feminino Naturalidade: _____ Município de residência: _____

Sinais e sintomas 1() Sim 2() Não 3() Sem informação 1() Cefaleia 2() Náusea 3() Vômito 4() Febre 5() Tonturas 6() Convulsões 7() Fotofobia 8() Sonolência 9() Rigidez de nuca 10() Deficit motor 11() Confusão mental 12() Anorexia 13() ↓ Diurese Outros: _____		Sinais e sintomas Tempo do início dos sintomas: ____ dias /ou data ____/____/____. Glasgow _____ Comorbidades: 1() Sim 2() Não 3() Sem informação 1() HAS 2() DM 3() DPOC/asma 4() HTLV 5() Hepatite B/C 6() Sarcoma de Kaposi 7() Neoplasia Qual(is): _____ 8() Outros _____		Pesquisa de antígeno no LCR- Diagnóstico-1dia 1() Reagente 2() Não-reagente 3() Não realizado 4() Sem informação Título: _____ () Sem inf.		Tinta da China LCR -1dia 1() Positivo 2() Negativo 3() Sem informação Contagem de leveduras: _____ /mm ³	
Hipertensão Intracraniana no 1d 1() Sim 2() Não () Sem informação Pressão de abertura no 1º dia: ____ cmH ₂ O () Sem informação Hipertensão intracraniana durante tratamento 1() Sim 2() Não () Sem informação Nº de punções até normalizar (<25cmH ₂ O) _____ punções. Necessidade de derivação 1() Sim 2() Não 3() Sem informação Data: ____/____/____.			Outro sítio envolvido 1() Sim 2() Não 3() Sem informação 1() sangue- cultura positiva: 1() Sim 2() Não 3() NR 3() escarro - cultura positiva: 1() Sim 2() Não 3() NR 5() pulmão -cultura positiva: 1() Sim 2() Não 3() NR 7() TGU - cultura positiva: 1() Sim 2() Não 3() NR 9() urina - cultura positiva: 1() Sim 2() Não 3() NR 2() pele - cultura positiva: 1() Sim 2() Não 3() NR 4() LBA - cultura positiva: 1() Sim 2() Não 3() NR 6() TGI - cultura positiva: 1() Sim 2() Não 3() NR 8() Linfonodo- cultura positiva: 1() Sim 2() Não 3() NR Outros sítios: _____				
Infecção por HIV 1() Sim 2() Não () Sem informação Tempo de diagnóstico: ____ meses Carga viral _____ cópias/ml CD4 inicial _____ cels/μl CD8 inicial _____ cels/μl CD4/CD8 _____ Data do exame: ____/____/____.		Outra infecção na internação 1() Sim 2() Não 3() Sem informação 1() Neurotoxoplasmose 2() Pneumocistose 3() Tuberculose 4() Sífilis 5() CMV 6() LEMP 7() Candidíase esofágica Outras: _____		Ressonância magnética 1() Sim 2() Não 3() Sem informação 1() sem alteração 2() criptococoma 3() pseudocisto 4() edema cerebral 5() atrofia cortical 6() sem descrição 7() outros _____ Tomografia Computadorizada 1() Sim 2() Não () Sem informação 1() sem alteração 2() criptococoma 3() pseudocisto 4() edema cerebral 5() atrofia cortical 6() sem descrição 7() outros _____		Tratamento Antiretroviral 1() Regular 2() Irregular 3() Abandono 4() Virgem de tratamento 5() Sem informação Qual TARV: _____	
Internação U.T.I. 1() Sim 2() Não 3() Sem informação Data da 1ª internação: ____/____/____. Número de internações na U.T.I.: _____ Tempo de internação: _____ dias		Desfecho hospitalar 1() Alta hospitalar-data: ____/____/____. 2() Óbito- data: ____/____/____. Principal causa do óbito: _____		Sequelas provenientes da criptococose 1() Sim 2() Não () Sem informação Qual(is): _____		Recidiva-em até 6 meses após alta hospitalar 1() Sim 2() Não 3() Sem informação Data da recidiva: ____/____/____.	

Continua

Continuação

Apêndice 1 – Ficha de coleta de dados utilizada para coleta das informações dos pacientes neurocriptococose, internados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012-12/2013 e 01/2015-08/2017. Página 2 (verso)

Dia de internação	Liquor									Função renal- níveis séricos		Tratamento Criptococose
	Pressão de abertura	Cultura	Tinta da China	Leveduras (cels./mm ³)	Pesquisa de antígeno	Título	Glicose (mg/dL)	Proteínas (mg/dL)	Celularidade total (L, M, N, Ma, E, B)	Creatinina	Uréia	
1dia Data	_____ (cmH ₂ O/mm Hg) ()N.R.	()Pos. ()Neg. ()N.R.	()Pos. ()Neg. ()N.R.		1()Reag. 2()Não-reag. 3()Sem inf. 4()N.R.				Total: _____ células _____ _____ _____ _____ _____	()NR _____ mg/dL	()NR _____ mg/dL	1Anfotericina B 1()Sim 2()Não 1()0,7-1mg/kg 2()1mg/kg Outra dose:_____
7dia Data	_____ ()N.R.	()Pos. ()Neg. ()N.R.	()Pos. ()Neg. ()N.R.		1()Reag. 2()Não-reag. 3()Sem inf. 4()N.R.				Total: _____ células _____ _____ _____ _____ _____	()NR _____ mg/dL	()NR _____ mg/dL	2Fluconazol 1()Sim 2()Não 1() <800mg/dia 2()800-1200mg/dia Outra dose:_____
14dia Data	_____ ()N.R.	()Pos. ()Neg. ()N.R.	()Pos. ()Neg. ()N.R.		1()Reag. 2()Não-reag. 3()Sem inf. 4()N.R.				Total: _____ células _____ _____ _____ _____ _____	()NR _____ mg/dL	()NR _____ mg/dL	3Flucitosina 1()Sim 2()Não () <100mg/kg/dia 2()100mg/kg/dia Outra dose:_____
21dia Data	_____ ()N.R.	()Pos. ()Neg. ()N.R.	()Pos. ()Neg. ()N.R.		1()Reag. 2()Não-reag. 3()Sem inf. 4()N.R.				Total: _____ células _____ _____ _____ _____ _____	()NR _____ mg/dL	()NR _____ mg/dL	Outra fármaco:_____ _____ _____ Tempo de indução:_____ dias ()Sem informação
28dia Data	_____ ()N.R.	()Pos. ()Neg. ()N.R.	()Pos. ()Neg. ()N.R.		1()Reag. 2()Não-reag. 3()Sem inf. 4()N.R.				Total: _____ células _____ _____ _____ _____ _____	()NR _____ mg/dL	()NR _____ mg/dL	

Apêndice 2- Curva de eficiência de amplificação dos pares de *primers* e sondas Taqman® do gene referente ao cromossomo 1, gerado na padronização da reação de PCR em Tempo Real A) Curva de amplificação das diluições seriadas de DNA da cepas H99; B) Gráfico de regressão linear estabelecido pelo software do aparelho de PCR em Tempo Real.

Continua

Continuação

Apêndice 2- Curva de eficiência de amplificação dos pares de *primers* e sondas Taqman® do gene referente ao cromossomo 3, gerado na padronização da reação de PCR em Tempo Real A) Curva de amplificação das diluições seriadas de DNA da cepas H99; B) Gráfico de regressão linear estabelecido pelo software do aparelho de PCR em Tempo Real.

Continua

Continuação

Apêndice 2- Curva de eficiência de amplificação dos pares de *primers* e sondas Taqman® do gene referente ao cromossomo 4, gerado na padronização da reação de PCR em Tempo Real A) Curva de amplificação das diluições seriadas de DNA da cepas H99; B) Gráfico de regressão linear estabelecido pelo software do aparelho de PCR em Tempo Real.

Apêndice 3 - Curvas de *Melting* dos pares de *primers* usados da reação de PCR em Tempo Real com o intercalante de DNA EvaGreen® e DNA da cepa *Cryptocococcus neoformans* H99. A) par de *primer* referente ao cromossomo 1 (CR1A e CR1B); B) par de *primer* referente ao cromossomo 3 (CR3); C) par de *primer* referente ao cromossomo 4 (CR4A e CR4B)

Apêndice 4 - Tabela com os resultados da análise univariável de todas as variáveis categóricas analisadas, em relação ao óbito hospitalar, dos pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012 a 12/2013 e 01/2015 a 08/2017)

Variáveis	Total N/Total (%)	Óbitos N/Total (%)	Sobreviventes N/Total (%)	p-valor
Residencia RMSP	86/89 (96,63%)	22/22 (100%)	64/67 (95,52%)	0,572
homens	74/96 (77,08%)	20/25 (80%)	53/68 (77,94%)	1
genótipo VNI	77/96 (80,21%)	18/25 (72%)	57/68 (83,82%)	0,24
genótipo VNII	16/96 (16,67%)	6/25 (24%)	9/68 (13,24%)	0,219
genótipo VGII	3/96 (3,13%)	1/25 (4%)	2/68 (2,94%)	1
resistencia FCZ (MIC <16 mg/L)	27/96 (28,13%)	7/25 (28%)	20/68 (29,41%)	1
tolerancia AMB I (colonias a partir de 24h TK)	57/96 (59,38%)	11/25 (44%)	44/68 (64,71%)	0,096
tolerancia AMB II (colonias a partir de 48h TK)	34/96 (35,42%)	6/25 (24%)	28/68 (41,18%)	0,151
altamente heterorresistentes I (NHF >32mg/L)	87/96 (90,63%)	22/25 (88%)	62/68 (91,18%)	0,698
altamente heterorresistentes II (NHF >64mg/L)	36/96 (37,5%)	10/25 (40%)	26/68 (38,24%)	1
cefaléia	77/90 (85,56%)	16/22 (72,73%)	61/68 (89,71%)	0,077
náusea	28/90 (31,11%)	6/22 (27,27%)	22/68 (32,35%)	0,793
vômito	42/90 (46,67%)	10/22 (45,45%)	32/68 (47,06%)	1
febre	35/90 (38,89%)	9/22 (40,91%)	26/68 (38,24%)	1
tonturas	15/90 (16,67%)	6/22 (27,27%)	9/68 (13,24%)	0,185
convulsões	12/90 (13,33%)	6/22 (27,27%)	6/68 (8,82%)	0,064
confusão mental	19/90 (21,11%)	8/22 (36,36%)	11/68 (16,18%)	0,069
rigidez de nuca	3/90 (3,33%)	0/22 (0%)	3/68 (4,41%)	1
sonolencia	5/90 (5,56%)	1/22 (4,55%)	4/68 (5,88%)	1
fotofobia	4/90 (4,44%)	1/22 (4,55%)	3/68 (4,41%)	1
deficit motor	3/90 (3,33%)	1/22 (4,55%)	2/68 (2,94%)	1
torporoso	4/90 (4,44%)	3/22 (13,64%)	1/68 (1,47%)	0,044
perda de memória	1/90 (1,11%)	1/22 (4,55%)	0/68 (0%)	0,244
diminuição da acuidade visual	1/90 (1,11%)	0/22 (0%)	1/68 (1,47%)	1
anorexia	9/90 (10%)	1/22 (4,55%)	8/68 (11,76%)	0,444
rebaixamento do nível de consciência	1/90 (1,11%)	1/22 (4,55%)	0/68 (0%)	0,244
perda de peso	10/90 (11,11%)	4/22 (18,18%)	6/68 (8,82%)	0,251
astenia	4/90 (4,44%)	0/22 (0%)	4/68 (5,88%)	0,569
diarréia	2/90 (2,22%)	1/22 (4,55%)	1/68 (1,47%)	0,431
dispneia	1/90 (1,11%)	1/22 (4,55%)	0/68 (0%)	0,244
dor de garganta	1/90 (1,11%)	0/22 (0%)	1/68 (1,47%)	1
tosse	2/90 (2,22%)	1/22 (4,55%)	1/68 (1,47%)	0,431
disartria	1/90 (1,11%)	0/22 (0%)	1/68 (1,47%)	1
parapesia	1/90 (1,11%)	0/22 (0%)	1/68 (1,47%)	1
dislalia	1/90 (1,11%)	0/22 (0%)	1/68 (1,47%)	1
turvação visual	2/90 (2,22%)	0/22 (0%)	2/68 (2,94%)	1
presença de comorbidades	27/90 (30%)	8/22 (36,36%)	19/68 (27,94%)	0,593
hipertensão	6/90 (6,67%)	5/22 (22,73%)	1/68 (1,47%)	0,003
diabetes	5/90 (5,56%)	2/22 (9,09%)	3/68 (4,41%)	0,592
DPOC	1/90 (1,11%)	0/22 (0%)	1/68 (1,47%)	1
hepatites	11/90 (12,22%)	3/22 (13,64%)	8/68 (11,76%)	1
HTLV	1/90 (1,11%)	0/22 (0%)	1/68 (1,47%)	1
sarcoma de kaposi	7/90 (7,78%)	1/22 (4,55%)	6/68 (8,82%)	1

Continua

continuação

Apêndice 4 - Tabela com os resultados da análise univariável de todas as variáveis categóricas analisadas, em relação ao óbito hospitalar, dos pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012 a 12/2013 e 01/2015 a 08/2017)

Variáveis	Total N/Total (%)	Óbitos N/Total (%)	Sobreviventes N/Total (%)	p-valor
miocardite aguda	1/90 (1,11%)	0/22 (0%)	1/68 (1,47%)	1
anemia	3/90 (3,33%)	0/22 (0%)	3/68 (4,41%)	1
linfoma	3/90 (3,33%)	2/22 (9,09%)	1/68 (1,47%)	0,147
pancitopenia	1/90 (1,11%)	0/22 (0%)	1/68 (1,47%)	1
imunodeficia primaria	1/90 (1,11%)	0/22 (0%)	1/68 (1,47%)	1
doença do refluxo gastro-esofágico	1/90 (1,11%)	1/22 (4,55%)	0/68 (0%)	0,244
1D antígeno no LCR positivo	39/49 (79,59%)	11/11 (100%)	28/38 (73,68%)	0,09
1D Tinta da China LCR positiva	79/90 (87,78%)	20/22 (90,91%)	59/68 (86,76%)	1
1D cultura de LCR positiva	87/89 (97,75%)	22/22 (100%)	65/67 (97,01%)	1
1D hipertensão intracraniana (>20H2O)	54/69 (78,26%)	13/16 (81,25%)	41/53 (77,36%)	1
hipertensão intracraniana durante tratamento	54/78 (69,23%)	13/18 (72,22%)	41/60 (68,33%)	1
derivação peritoneal	14/90 (15,56%)	3/22 (13,64%)	11/68 (16,18%)	1
tratamento anfotericina B	89/89 (100%)	22/22 (100%)	67/67 (100%)	
tratamento anfotericina Blipossomal	4/89 (4,49%)	0/22 (0%)	4/67 (5,97%)	0,568
tratamento fluconazol	48/89 (53,93%)	13/22 (59,09%)	35/67 (52,24%)	0,629
tratamento flucitosina	45/89 (50,56%)	11/22 (50%)	34/67 (50,75%)	1
terapia AMB e FCZ	42/89 (47,19%)	9/22 (40,91%)	33/67 (49,25%)	0,624
terapia AMB e flucitosina	45/89 (50,56%)	11/22 (50%)	34/67 (50,75%)	1
cultura positiva em outro sitio	20/89 (22,47%)	9/22 (40,91%)	11/67 (16,42%)	0,036
cultura positiva no sangue	18/89 (20,22%)	8/22 (36,36%)	10/67 (14,93%)	0,062
cultura positiva no pulmão	1/89 (1,12%)	0/22 (0%)	1/67 (1,49%)	1
cultura positiva no pele	3/89 (3,37%)	2/22 (9,09%)	1/67 (1,49%)	0,15
cultura positiva no linfonodo	1/89 (1,12%)	1/22 (4,55%)	0/67 (0%)	0,247
infecção pelo HIV	87/90 (96,67%)	21/22 (95,45%)	66/68 (97,06%)	1
outra infecção	53/90 (58,89%)	13/22 (59,09%)	40/68 (58,82%)	1
neurotoxoplasmose	9/90 (10%)	3/22 (13,64%)	6/68 (8,82%)	0,683
pneumocistose	7/90 (7,78%)	2/22 (9,09%)	5/68 (7,35%)	1
tuberculose	15/90 (16,67%)	5/22 (22,73%)	10/68 (14,71%)	0,51
neurotuberculose	5/90 (5,56%)	1/22 (4,55%)	4/68 (5,88%)	1
sífilis	8/90 (8,89%)	2/22 (9,09%)	6/68 (8,82%)	1
cmv	12/90 (13,33%)	3/22 (13,64%)	9/68 (13,24%)	1
lemp	1/90 (1,11%)	0/22 (0%)	1/68 (1,47%)	1
candidiase oroesofágica	20/90 (22,22%)	5/22 (22,73%)	15/68 (22,06%)	1
candidemia	1/90 (1,11%)	0/22 (0%)	1/68 (1,47%)	1
aspergilose	1/90 (1,11%)	1/22 (4,55%)	0/68 (0%)	0,244
pneumonia	11/90 (12,22%)	6/22 (27,27%)	5/68 (7,35%)	0,022
herpes	6/90 (6,67%)	0/22 (0%)	6/68 (8,82%)	0,33
criptosporidiose	1/90 (1,11%)	0/22 (0%)	1/68 (1,47%)	1
bacteremia	1/90 (1,11%)	1/22 (4,55%)	0/68 (0%)	0,244

continua

Apêndice 4 - Tabela com os resultados da análise univariável de todas as variáveis categóricas analisadas, em relação ao óbito hospitalar, dos pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012 a 12/2013 e 01/2015 a 08/2017)

Variáveis	Total N/Total (%)	Óbitos N/Total (%)	Sobreviventes N/Total (%)	p-valor
Ressonância magnética- sem alteração	8/90 (8,89%)	0/22 (0%)	8/68 (11,76%)	0,192
criptocococa	4/90 (4,44%)	1/22 (4,55%)	3/68 (4,41%)	1
pseudocisto	4/90 (4,44%)	1/22 (4,55%)	3/68 (4,41%)	1
edema cerebral	2/90 (2,22%)	1/22 (4,55%)	1/68 (1,47%)	0,431
atrofia cortical	2/90 (2,22%)	1/22 (4,55%)	1/68 (1,47%)	0,431
sem descrição	4/90 (4,44%)	0/22 (0%)	4/68 (5,88%)	0,569
dilatação ventricular	2/90 (2,22%)	1/22 (4,55%)	1/68 (1,47%)	0,431
lesões múltiplas	4/90 (4,44%)	1/22 (4,55%)	3/68 (4,41%)	1
microadenoma	1/90 (1,11%)	0/22 (0%)	1/68 (1,47%)	1
ventriculite	1/90 (1,11%)	0/22 (0%)	1/68 (1,47%)	1
Tomografia computadorizada- sem alteração	42/90 (46,67%)	8/22 (36,36%)	34/68 (50%)	0,329
criptococoma	1/90 (1,11%)	0/22 (0%)	1/68 (1,47%)	1
pseudocisto	1/90 (1,11%)	0/22 (0%)	1/68 (1,47%)	1
edema cerebral	4/90 (4,44%)	3/22 (13,64%)	1/68 (1,47%)	0,044
atrofia cortical	15/90 (16,67%)	2/22 (9,09%)	13/68 (19,12%)	0,343
sem descrição	1/90 (1,11%)	1/22 (4,55%)	0/68 (0%)	0,244
lesões múltiplas	7/90 (7,78%)	2/22 (9,09%)	5/68 (7,35%)	1
dilatação ventricular	4/90 (4,44%)	3/22 (13,64%)	1/68 (1,47%)	0,044
lesão hipotenuante	7/90 (7,78%)	1/22 (4,55%)	6/68 (8,82%)	1
calcificação	2/90 (2,22%)	1/22 (4,55%)	1/68 (1,47%)	0,431
isquemia	1/90 (1,11%)	0/22 (0%)	1/68 (1,47%)	1
assimetria ventricular	1/90 (1,11%)	1/22 (4,55%)	0/68 (0%)	0,244
Uso de TARV- regular	17/90 (18,89%)	3/22 (13,64%)	14/68 (20,59%)	0,549
Uso de TARV- irregular	23/90 (25,56%)	4/22 (18,18%)	19/68 (27,94%)	0,415
Uso de TARV- abandono	17/90 (18,89%)	5/22 (22,73%)	12/68 (17,65%)	0,754
Uso de TARV- virgem de tratamento	29/90 (32,22%)	8/22 (36,36%)	21/68 (30,88%)	0,793
UTI	27/90 (30%)	15/22 (68,18%)	12/68 (17,65%)	0
7D antígeno no LCR positivo	6/12 (50%)	1/5 (20%)	5/7 (71,43%)	0,242
7D tinta da china LCR positiva	66/78 (84,62%)	15/17 (88,24%)	51/61 (83,61%)	1
7D cultura de LCR positiva	52/75 (69,33%)	14/16 (87,5%)	38/59 (64,41%)	0,125
7D hipertensão intracraniana	20/46 (43,48%)	5/11 (45,45%)	15/35 (42,86%)	1
14D antígeno no LCR positivo	7/16 (43,75%)	1/2 (50%)	6/14 (42,86%)	1
14D tinta da china LCR positiva	48/66 (72,73%)	9/9 (100%)	39/57 (68,42%)	0,1
14D cultura positiva LCR	17/65 (26,15%)	5/8 (62,5%)	12/57 (21,05%)	0,024

Apêndice 5 - Tabela com os resultados da análise univariável de todas as variáveis quantitativas analisadas, em relação ao óbito hospitalar, dos pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012 a 12/2013 e 01/2015 a 08/2017)

Variáveis	Total Média (iqq)	Óbitos Média (iqq)	Sobreviventes Média (iqq)	p-valor
idade	38,69(29-46)	44,25(36-52,5)	36,41(28-44,5)	0,008
MIC FCZ	9,39(1-16)	10,34(1-16)	9,28(1-16)	0,410
MIC AMB	0,23(0,125-0,25)	0,23(0,125-0,25)	0,23(0,125-0,25)	0,947
TK 1mg/L AMB	27,87(12-48)	24(6-24)	29,81(12-48)	0,167
NHF	45,83(32-64)	45,44(32-64)	46,59(32-64)	0,924
dias entre internação e alta/óbito	40,69(23-54)	38,16(10-57)	41,62(28,5-48,5)	0,147
escala de coma de Glasgow	14,58(15-15)	13,95(14-15)	14,78(15-15)	0,000
1D contagem de leveduras no LCR	749,52(6-665)	1696,36(340-2240)	443,19(3-384)	0,000
1D pressão de abertura no LCR	39,38(22,44-50)	47,93(26,22-60,58)	36,79(20,5-50)	0,206
1D LCR glicose (mg/dL)	40,9(24-49)	36,67(21-48)	42,22(27-51)	0,642
1D LCR proteína (mg/dL)	102,46(36-104)	168,95(54-103)	81,93(35-105)	0,364
1D celularidade global	51,98(3-55)	46,14(3-42)	53,78(3-55)	0,739
1D contagem de linfócitos	69,47(70-92)	67,39(51-93)	70,1(70-91)	0,643
1D contagem de monócitos	7,69(4-10)	6,83(4-11)	7,95(4-10)	0,664
1D contagem de neutrófilos	4,82(0-4)	2,78(0-3)	5,44(0-6)	0,581
1D contagem de macrófagos	0,55(0-0)	0,78(0-0)	0,47(0-0)	0,514
1D contagem de eosinófilos	0,47(0-0)	0,33(0-0)	0,51(0-0)	0,365
1D contagem de basófilos	0,09(0-0)	0,11(0-0)	0,08(0-0)	0,735
1D dosagem de creatinina	0,92(0,72-0,98)	0,95(0,74-1,05)	0,91(0,71-0,97)	0,389
1D dosagem de ureia	33,41(21-40)	42,86(22-48)	30(21-35)	0,058
tempo de terapia de indução antifúngica (dias)	31,1(20-40)	27,3(6,5-44)	32,26(22-40)	0,142
tempo_de diagnostico HIV (meses)	80,65(1-146)	98,59(1,48-188,58)	75,13(1-133,83)	0,534
carga viral HIV	242555,7(1824-332156)	237477,3(5521-373464)	244054,3(1824-311000)	0,717
contagem de CD4	70,37(16-78)	54,67(18-66)	74,72(11-78)	0,851
contagem de CD8	527,76(213,5-81)	584,94(209-1082)	511,29(218-744)	0,654
relação CD4/CD8	0,2(0,04-0,18)	0,23(0,06-0,2)	0,19(0,04-0,16)	0,549
tempo na UTI (dias)	12,59(2-21)	16,87(4-27)	7,25(2-8)	0,203
numero de internações na UTI	1,11(1-1)	1,07(1-1)	1,17(1-1)	0,420
7D contgem de leveduras no LCR	211,08(1-102)	457,41(1-420)	142,43(1-59)	0,061
7D pressão de abertura no LCR	24,66(12,5-36,8)	18,62(10-22,5)	26,56(13,5-40)	0,334
7D LCR glicose (mg/dL)	41,59(26-54)	45,2(19-79)	40,68(26-51)	0,762
7D LCR proteína (mg/dL)	92,96(40-125)	117,4(44-156)	86,75(40-114)	0,170

continua

Apêndice 5 - Tabela com os resultados da análise univariável de todas as variáveis quantitativas analisadas, em relação ao óbito hospitalar, dos pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012 a 12/2013 e 01/2015 a 08/2017)

Variáveis	Total Média (iqq)	Óbitos Média (iqq)	Sobreviventes Média (iqq)	p-valor
7D celularidade global	52,24(8-79)	63,94(7-107)	49,02(8-68)	0,470
7D contagem de linfócitos	77,15(78,5-91)	83,25(85-95)	75,41(78-90,5)	0,101
7D contagem de monócitos	7,17(4-10)	7(4,5-9)	7,21(4-10)	0,770
1D contagem de neutrófilos	4,39(0-4)	2(0-2,5)	5,07(0-4,5)	0,753
7D contagem de macrófagos	1,07(0-0,5)	0,44(0-0)	1,25(0-1)	0,209
7D contagem de eosinófilos	1,1(0-0,5)	0(0-0)	1,41(0-2)	0,010
7D contagem de basófilos	0,82(0-0)	0,88(0-0)	0,8(0-0)	0,380
7D dosagem de creatinina	1,33(0,92-1,48)	1,64(0,97-2,24)	1,24(0,88-1,44)	0,171
7D dosagem de ureia	53,44(25,5-62,5)	84,88(57-104)	43,73(24-54)	0,000
14D contagem de leveduras no LCR	56,24(0-26)	29,33(7-46)	60,49(0-16)	0,030
14D pressão de abertura no LCR	23,55(12,6-30)	33,04(28-43)	21,97(12,6-25,8)	0,104
14D LCR glicose (mg/dL)	47,9(34-56)	65,22(32-72)	44,96(36-56)	0,653
14D LCR proteína (mg/dL)	67,55(41-81)	71,89(49-84)	66,81(40-78)	0,424
14D celularidade global	32,92(5-52)	36,67(2-77)	32,28(5-46)	0,992
14D contagem de linfócitos	83,98(84,5-94)	80,33(86-93)	84,68(84-94)	0,876
14D contagem de monócitos	6,57(3-10)	5(2-8)	6,87(4-10)	0,227
14D contagem de neutrófilos	3,98(0-1,5)	13,44(0-6)	2,17(0-1)	0,095
14D contagem de macrófagos	0,88(0-0)	1(0-1)	0,85(0-0)	0,546
14D contagem de eosinófilos	0,23(0-0)	0,22(0-0)	0,23(0-0)	0,950
14D contagem de basófilos	0,34(0-0)	0(0-0)	0,4(0-0)	0,132
14D dosagem de creatinina	1,38(0,96-1,54)	2,05(1,075-2,12)	1,22(0,885-1,50)	0,076
14D dosagem de ureia	48(24-61)	88,91(47-134)	39,35(24-49)	0,001

Apêndice 6 - Resultados do teste de correlação de Pearson das variáveis quantitativas que apresentaram p valor < 0,20 em relação ao óbito, nos pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012 a 12/2013 e 01/2015 a 08/2017).

			1D contagem de leveduras	1D dosagem de ureia	7D contagem de leveduras	7D contagem de linfócitos	7D contagem de eosinofilos	7D dosagem de ureia	14D contagem de leveduras	14D pressão de abertura	14D contagem de neutrófilos	14D dosagem de creatinina	14D dosagem de ureia
idade	10,00												
Glasgow	-0,73	10,00											
1D contagem de leveduras	0,22	0,05	10,00										
1D dosagem de ureia	0,01	-0,05	0,03	10,00									
7D contagem de leveduras	-0,24	0,10	0,04	0,02	10,00								
7D contagem de linfócitos	0,47	-0,18	0,16	0,26	-0,61	10,00							
7D contagem de eosinofilos	0,21	-0,55	-0,20	-0,09	-0,22	0,11	10,00						
7D dosagem de ureia	-0,22	0,06	0,06	0,32	0,01	-0,45	-0,29	10,00					
14D contagem de leveduras	-0,21	0,09	0,08	0,04	1,00	-0,57	-0,24	0,00	10,00				
14D pressão de abertura	-0,20	0,17	-0,29	0,12	0,00	-0,01	-0,33	-0,01	0,01	10,00			
14D contagem de neutrófilos	-0,35	0,21	-0,09	-0,27	-0,06	-0,56	-0,08	0,53	-0,09	0,05	10,00		
14D dosagem de creatinina	-0,48	0,32	-0,18	0,38	0,06	-0,22	-0,31	0,41	0,04	0,55	0,34	10,00	
14D dosagem de ureia	-0,28	0,12	0,01	0,62	0,01	-0,28	-0,31	0,80	0,00	0,21	0,38	0,71	10,00

Apêndice 7 – Tabela com os resultados da análise múltipla por Regressão Logística das variáveis idade, contagem de leveduras no LCR no 1D , HAS/CNTC e dosagem de ureia do 1D, associadas ao óbito hospitalar em pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012 a 12/2013 e 01/2015 a 08/2017). Número de observações: 83

Variável	Odds Ratio	Intervalo de confiança (IC 95%)	p-valor
Idade	1,07	1,00-1,14	0,01
Contagem de leveduras no LCR do 1D- log (log)	1,59	1,13-2,23	0,007
HAS/CNTC	55,12	6,30-482,27	0,000
Dosagem de ureia 1D > 40 mg/dL	6,16	1,31	29,00

Apêndice 8 - Tabela com os resultados da análise univariável de todas as variáveis categóricas analisadas em relação ao desfecho composto, nos pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012 a 12/2013 e 01/2015 a 08/2017). Desfecho composto foi definido pelos seguintes eventos: óbito hospitalar, encaminhamento para UTI durante a internação, recidiva da criptococose 180 dias após a alta hospitalar.

Variáveis	Total No./Total (%)	Pessoas com desfecho No./total (%)	Pessoas sem desfecho No./total (%)	p-valor
residência RMSP	86/89 (96,63%)	45/45 (100%)	41/44 (93,18%)	0,117
homens	74/96 (77,08%)	37/48 (77,08%)	36/45 (80%)	0,804
genótipo VNI	77/96 (80,21%)	37/48 (77,08%)	38/45 (84,44%)	0,437
genótipo VNII	16/96 (16,67%)	8/48 (16,67%)	7/45 (15,56%)	1
genótipo VGII	3/96 (3,13%)	3/48 (6,25%)	0/45 (0%)	0,243
resistencia FCZ (MIC <16 mg/L)	27/96 (28,13%)	15/48 (31,25%)	12/45 (26,67%)	0,655
tolerancia AMB I (colonias a partir de 24h TK)	13/96 (13,54%)	5/48 (10,42%)	7/45 (15,56%)	0,544
tolerancia AMB II (colonias a partir de 48h TK)	57/96 (59,38%)	30/48 (62,5%)	25/45 (55,56%)	0,532
altamente heterorresistentes I (NHF $\geq$ 32mg/L)	87/96 (90,63%)	44/48 (91,67%)	40/45 (88,89%)	0,735
altamente heterorresistentes II (NHF $\geq$ 64mg/L)	36/96 (37,5%)	21/48 (43,75%)	15/45 (33,33%)	0,395
cefaléia	77/90 (85,56%)	36/45 (80%)	41/45 (91,11%)	0,23
náusea	28/90 (31,11%)	14/45 (31,11%)	14/45 (31,11%)	1
vômito	42/90 (46,67%)	24/45 (53,33%)	18/45 (40%)	0,291
febre	35/90 (38,89%)	18/45 (40%)	17/45 (37,78%)	1
tonturas	15/90 (16,67%)	11/45 (24,44%)	4/45 (8,89%)	0,087
convulsões	12/90 (13,33%)	8/45 (17,78%)	4/45 (8,89%)	0,353
confusão mental	19/90 (21,11%)	12/45 (26,67%)	7/45 (15,56%)	0,302
rigidez de nuca	3/90 (3,33%)	3/45 (6,67%)	0/45 (0%)	0,242
sonolencia	5/90 (5,56%)	3/45 (6,67%)	2/45 (4,44%)	1
fotofobia	4/90 (4,44%)	2/45 (4,44%)	2/45 (4,44%)	1
deficit motor	3/90 (3,33%)	3/45 (6,67%)	0/45 (0%)	0,242
torporoso	4/90 (4,44%)	3/45 (6,67%)	1/45 (2,22%)	0,616
perda de memória	1/90 (1,11%)	1/45 (2,22%)	0/45 (0%)	1
diminuição da acuidade visual	1/90 (1,11%)	1/45 (2,22%)	0/45 (0%)	1
anorexia	9/90 (10%)	2/45 (4,44%)	7/45 (15,56%)	0,157
rebaixamento do nível de consciência	1/90 (1,11%)	1/45 (2,22%)	0/45 (0%)	1
perda de peso	10/90 (11,11%)	5/45 (11,11%)	5/45 (11,11%)	1
astenia	4/90 (4,44%)	1/45 (2,22%)	3/45 (6,67%)	0,616
diarréia	2/90 (2,22%)	1/45 (2,22%)	1/45 (2,22%)	1
dispneia	1/90 (1,11%)	1/45 (2,22%)	0/45 (0%)	1
dor de garganta	1/90 (1,11%)	0/45 (0%)	1/45 (2,22%)	1
tosse	2/90 (2,22%)	2/45 (4,44%)	0/45 (0%)	0,494
disartria	1/90 (1,11%)	1/45 (2,22%)	0/45 (0%)	1
parapesia	1/90 (1,11%)	1/45 (2,22%)	0/45 (0%)	1
dislalia	1/90 (1,11%)	0/45 (0%)	1/45 (2,22%)	1
turvação visual	2/90 (2,22%)	0/45 (0%)	2/45 (4,44%)	0,494
presença de comorbidades	27/90 (30%)	13/45 (28,89%)	14/45 (31,11%)	1
hipertensão	6/90 (6,67%)	6/45 (13,33%)	0/45 (0%)	0,026
diabetes	5/90 (5,56%)	3/45 (6,67%)	2/45 (4,44%)	1

continua

continuação

Apêndice 8 - Tabela com os resultados da análise univariável de todas as variáveis categóricas analisadas em relação ao desfecho composto, nos pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012 a 12/2013 e 01/2015 a 08/2017). Desfecho composto foi definido pelos seguintes eventos: óbito hospitalar, encaminhamento para UTI durante a internação, recidiva da criptococose 180 dias após a alta hospitalar.

Variáveis	Total No./Total (%)	Pessoas com desfecho No./total (%)	Pessoas sem desfecho No./total (%)	p-valor
DPOC	1/90 (1,11%)	1/45 (2,22%)	0/45 (0%)	1
hepatites	11/90 (12,22%)	6/45 (13,33%)	5/45 (11,11%)	1
HTLV	1/90 (1,11%)	1/45 (2,22%)	0/45 (0%)	1
sarcoma de kaposi	7/90 (7,78%)	3/45 (6,67%)	4/45 (8,89%)	1
miocardite aguda	1/90 (1,11%)	0/45 (0%)	1/45 (2,22%)	1
anemia	3/90 (3,33%)	1/45 (2,22%)	2/45 (4,44%)	1
linfoma	3/90 (3,33%)	3/45 (6,67%)	0/45 (0%)	0,242
pancitopenia	1/90 (1,11%)	0/45 (0%)	1/45 (2,22%)	1
imunodeficia primaria	1/90 (1,11%)	1/45 (2,22%)	0/45 (0%)	1
doença do refluxo gastro-esofágico	1/90 (1,11%)	1/45 (2,22%)	0/45 (0%)	1
1D antígeno no LCR positivo	39/49 (79,59%)	16/21 (76,19%)	23/28 (82,14%)	0,726
1D Tinta da China LCR positiva	79/90 (87,78%)	42/45 (93,33%)	37/45 (82,22%)	0,197
1D cultura de LCR positiva	87/89 (97,75%)	44/44 (100%)	43/45 (95,56%)	0,494
1D hipertensão intracraniana (>20H2O)	54/69 (78,26%)	27/35 (77,14%)	27/34 (79,41%)	1
hipertensão intracraniana durante tratamento	54/78 (69,23%)	27/39 (69,23%)	27/39 (69,23%)	1
derivação peritoneal	14/90 (15,56%)	8/45 (17,78%)	6/45 (13,33%)	0,772
tratamento anfotericina B	89/89 (100%)	45/45 (100%)	44/44 (100%)	
tratamento anfotericina Blipossomal	4/89 (4,49%)	2/45 (4,44%)	2/44 (4,55%)	1
tratamento fluconazol	48/89 (53,93%)	25/45 (55,56%)	23/44 (52,27%)	0,833
tratamento flucitosina	45/89 (50,56%)	22/45 (48,89%)	23/44 (52,27%)	0,833
terapia AMB e FCZ	42/89 (47,19%)	21/45 (46,67%)	21/44 (47,73%)	1
terapia AMB e flucitosina	45/89 (50,56%)	22/45 (48,89%)	23/44 (52,27%)	0,833
cultura positiva em outro sitio	20/89 (22,47%)	14/45 (31,11%)	6/44 (13,64%)	0,074
cultura positiva no sangue	18/89 (20,22%)	14/45 (31,11%)	4/44 (9,09%)	0,016
cultura positiva no pulmão	1/89 (1,12%)	0/45 (0%)	1/44 (2,27%)	0,494
cultura positiva no pele	3/89 (3,37%)	2/45 (4,44%)	1/44 (2,27%)	1
cultura positiva no linfonodo	1/89 (1,12%)	1/45 (2,22%)	0/44 (0%)	1
infecção pelo HIV	87/90 (96,67%)	43/45 (95,56%)	44/45 (97,78%)	1
outra infecção	53/90 (58,89%)	27/45 (60%)	26/45 (57,78%)	1
neurotoxoplasmose	9/90 (10%)	8/45 (17,78%)	1/45 (2,22%)	0,03
pneumocistose	7/90 (7,78%)	4/45 (8,89%)	3/45 (6,67%)	1
tuberculose	15/90 (16,67%)	8/45 (17,78%)	7/45 (15,56%)	1
neurotuberculose	5/90 (5,56%)	2/45 (4,44%)	3/45 (6,67%)	1
sífilis	8/90 (8,89%)	2/45 (4,44%)	6/45 (13,33%)	0,266
CMV	12/90 (13,33%)	6/45 (13,33%)	6/45 (13,33%)	1
lemp	1/90 (1,11%)	1/45 (2,22%)	0/45 (0%)	1
candidíase oroesofágica	20/90 (22,22%)	12/45 (26,67%)	8/45 (17,78%)	0,447
candidemia	1/90 (1,11%)	1/45 (2,22%)	0/45 (0%)	1

continua

continuação

Apêndice 8 - Tabela com os resultados da análise univariável de todas as variáveis categóricas analisadas em relação ao desfecho composto, nos pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012 a 12/2013 e 01/2015 a 08/2017). Desfecho composto foi definido pelos seguintes eventos: óbito hospitalar, encaminhamento para UTI durante a internação, recidiva da criptococose 180 dias após a alta hospitalar.

Variáveis	Total No./Total (%)	Pessoas com desfecho No./total (%)	Pessoas sem desfecho No./total (%)	p-valor
aspergilose	1/90 (1,11%)	1/45 (2,22%)	0/45 (0%)	1
pneumonia	11/90 (12,22%)	9/45 (20%)	2/45 (4,44%)	0,05
herpes	6/90 (6,67%)	3/45 (6,67%)	3/45 (6,67%)	1
criptosporidiose	1/90 (1,11%)	1/45 (2,22%)	0/45 (0%)	1
bacteremia	1/90 (1,11%)	1/45 (2,22%)	0/45 (0%)	1
Ressonância magnética -sem alteração	8/90 (8,89%)	2/45 (4,44%)	6/45 (13,33%)	0,266
criptococoma	4/90 (4,44%)	3/45 (6,67%)	1/45 (2,22%)	0,616
pseudocisto	4/90 (4,44%)	3/45 (6,67%)	1/45 (2,22%)	0,616
edema cerebral	2/90 (2,22%)	1/45 (2,22%)	1/45 (2,22%)	1
atrofia cortical	2/90 (2,22%)	1/45 (2,22%)	1/45 (2,22%)	1
sem descrição	4/90 (4,44%)	1/45 (2,22%)	3/45 (6,67%)	0,616
dilatação ventricular	2/90 (2,22%)	1/45 (2,22%)	1/45 (2,22%)	1
lesões múltiplas	4/90 (4,44%)	2/45 (4,44%)	2/45 (4,44%)	1
microadenoma	1/90 (1,11%)	0/45 (0%)	1/45 (2,22%)	1
ventriculite	1/90 (1,11%)	1/45 (2,22%)	0/45 (0%)	1
Tomografia computadorizada -sem alteração	42/90 (46,67%)	17/45 (37,78%)	25/45 (55,56%)	0,139
criptococoma	1/90 (1,11%)	1/45 (2,22%)	0/45 (0%)	1
pseudocisto	1/90 (1,11%)	0/45 (0%)	1/45 (2,22%)	1
edema cerebral	4/90 (4,44%)	4/45 (8,89%)	0/45 (0%)	0,117
atrofia cortical	15/90 (16,67%)	8/45 (17,78%)	7/45 (15,56%)	1
sem descrição	1/90 (1,11%)	1/45 (2,22%)	0/45 (0%)	1
lesões múltiplas	7/90 (7,78%)	4/45 (8,89%)	3/45 (6,67%)	1
dilatação ventricular	4/90 (4,44%)	4/45 (8,89%)	0/45 (0%)	0,117
lesão hipoatenuante	7/90 (7,78%)	4/45 (8,89%)	3/45 (6,67%)	1
calcificação	2/90 (2,22%)	1/45 (2,22%)	1/45 (2,22%)	1
Isquemia	1/90 (1,11%)	0/45 (0%)	1/45 (2,22%)	1
assimetria ventricular	1/90 (1,11%)	1/45 (2,22%)	0/45 (0%)	1
Uso de TARV- regular	17/90 (18,89%)	6/45 (13,33%)	11/45 (24,44%)	0,281
Uso de TARV- irregular	23/90 (25,56%)	10/45 (22,22%)	13/45 (28,89%)	0,629
Uso de TARV- abandono	17/90 (18,89%)	11/45 (24,44%)	6/45 (13,33%)	0,281
Uso de TARV- virgem de tratamento	29/90 (32,22%)	15/45 (33,33%)	14/45 (31,11%)	1
7D antígeno no LCR positivo	6/12 (50%)	2/6 (33,33%)	4/6 (66,67%)	0,567
7D tinta da china LCR positiva	66/78 (84,62%)	35/39 (89,74%)	31/39 (79,49%)	0,347
7D cultura de LCR positiva	52/75 (69,33%)	32/37 (86,49%)	20/38 (52,63%)	0,002
7D hipertensão intracraniana	20/46 (43,48%)	9/22 (40,91%)	11/24 (45,83%)	0,774
14D antígeno no LCR positivo	7/16 (43,75%)	2/5 (40%)	5/11 (45,45%)	1
14D tinta da china LCR positiva	48/66 (72,73%)	21/25 (84%)	27/41 (65,85%)	0,156
14D cultura positiva LCR	17/65 (26,15%)	8/25 (32%)	9/40 (22,5%)	0,404

Apêndice 9 - Tabela com os resultados da análise univariável de todas as variáveis quantitativas analisadas em relação ao desfecho composto, nos pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012 a 12/2013 e 01/2015 a 08/2017).

Variáveis	Total Média (iqq)	Pessoas com desfecho Média (iqq)	Pessoas sem desfecho Média (iqq)	p-valor
idade	38,69(29-46)	40(29-50)	37(28-45)	0,235
MIC FCZ	9,39(1-16)	10(1,5-16)	88(1-16)	0,978
MIC AMB	0,23(0,125-0,25)	0,23(0,125-0,25)	0,23(0,125-0,25)	0,728
TK 1mg/L AMB	27,87(12-48)	29(12-48)	26(12-48)	0,582
NHF	45,83(32-64)	48(32-64)	44(32-64)	0,304
dias entre internação e alta/óbito	40,69(23-54)	43(19,5-57)	37(25-43)	0,327
escala de coma de Glasgow	14,58(15-15)	14(14-15)	15(15-15)	0,000
1D contagem de leveduras no LCR	749,52(6-665)	1281844(73-1670)	217,2(1-246)	0,000
1D pressão de abertura no LCR	39,38(22,44-50)	41(20,5-52)	37,46(23-47,6)	0,593
1D LCR glicose (mg/dL)	40,9(24-49)	42(27-49)	39,87(22-46)	0,815
1D LCR proteína (mg/dL)	102,46(36-104)	113(35-86,5)	91,89(41-125)	0,113
1D celularidade global	51,98(3-55)	3195455(1,5-33,5)	71,56(4-62)	0,269
1D contagem de linfócitos	69,47(70-92)	70(70-93)	68,98(69,5-91)	0,976
1D contagem de monócitos	7,69(4-10)	8105263(4-11)	7,28(3-10)	0,740
1D contagem de neutrófilos	4,82(0-4)	4921053(0-4)	4,72(0-4)	0,273
1D contagem de macrófagos	0,55(0-0)	1(0-2)	0,15(0-0)	0,013
1D contagem de eosinófilos	0,47(0-0)	0(0-0)	0,49(0-0)	0,894
1D contagem de basófilos	0,09(0-0)	0(0-0)	0,05(0-0)	0,224
1D dosagem de creatinina	0,92(0,72-0,98)	0,92(0,72-0,98)	0,91(0,72-0,98)	0,726
1D dosagem de ureia	33,41(21-40)	37,51(20-44)	29,22(22-34)	0,149
tempo de terapia de indução antifúngica (dias)	31,1(20-40)	32,6(21-42)	29,6(19-40)	0,340
Tempo de diagnostico HIV (meses)	80,65(1-146)	93,27(1,6-182,5)	68,32(0,8-133,83)	0,372
carga viral HIV	242555,7(1824- 332156)	262783,4(1935- 373464)	223808,1(1824- 311000)	0,617
contagem de CD4	70,37(16-78)	68,03(13-73)	72,56(18-78)	0,430
contagem de CD8	527,76(213,5-81)	514,31(192-907)	541,95(252-672)	0,685
relação CD4/CD8	0,2(0,04-0,18)	0,25(0,04-0,2)	0,14(0,04-0,16)	0,571
7D contagem de leveduras no LCR	211,08(1-102)	296,28(1-187)	12,59(1-24)	0,002
7D pressão de abertura no LCR	24,66(12,5-36,8)	22,28(10,2-23)	26,84(13,75-40,39)	0,333
7D LCR glicose (mg/dL)	41,59(26-54)	41,41(22-59)	41,78(29-49)	0,661
7D LCR proteína (mg/dL)	92,96(40-125)	105,84(35-152)	80,08(47-107)	0,746

Continua

Apêndice 9 - Tabela com os resultados da análise univariável de todas as variáveis quantitativas analisadas em relação ao desfecho composto, nos pacientes internados por neurocriptococose no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo (08/2012 a 12/2013 e 01/2015 a 08/2017).

Variáveis	Total Média (iqq)	Pessoas com desfecho Média (iqq)	Pessoas sem desfecho Média (iqq)	p-valor
7D celularidade global	52,24(8-79)	59,43(7-79)	45,05(10-70)	0,996
7D contagem de linfócitos	77,15(78,5-91)	73,65(76-90)	80,86(79-92)	0,269
7D contagem de monócitos	7,17(4-10)	7,08(4-10)	7,26(4-10)	0,932
1D contagem de neutrófilos	4,39(0-4)	5,51(0-5)	3,2(0-3)	0,247
7D contagem de macrófagos	1,07(0-0,5)	0,92(0-0)	1,23(0-2)	0,088
7D contagem de eosinófilos	1,1(0-0,5)	0,14(0-0)	0,8(0-1)	0,988
7D contagem de basófilos	0,82(0-0)	0,11(0-0)	0,49(0-0)	0,396
7D dosagem de creatinina	1,33(0,92-1,48)	1,49(0,95-1,62)	1,16(0,88-1,44)	0,328
7D dosagem de ureia	53,44(25,5-62,5)	68,97(41-81)	37,03(24-54)	0,001
14D contagem de leveduras no LCR	56,24(0-26)	37,08(1-40)	67,93(0-7)	0,047
14D pressão de abertura no LCR	23,55(12,6-30)	24,95(12,6-30)	22,73(13-25,8)	0,596
14D LCR glicose (mg/dL)	47,9(34-56)	50,68(32-52)	46,38(35-57,5)	0,508
14D LCR proteína (mg/dL)	67,55(41-81)	70,68(41-80)	65,83(39-81,5)	0,947
14D celularidade global	32,92(5-52)	33,91(9-62)	32,38(4,5-45)	0,768
14D contagem de linfócitos	83,98(84,5-94)	80,09(83-92)	86,5(85-95)	0,184
14D contagem de monócitos	6,57(3-10)	6(2-8)	6,94(4-10)	0,429
14D contagem de neutrófilos	3,98(0-1,5)	0,69(0-3)	0,21(0-1)	0,631
14D contagem de macrófagos	0,88(0-0)	1,41(0-2)	0,53(0-0)	0,063
14D contagem de eosinófilos	0,23(0-0)	0,23(0-0)	0,24(0-0)	0,595
14D contagem de basófilos	0,34(0-0)	0,5(0-0)	0,24(0-0)	0,880
14D dosagem de creatinina	1,38(0,96-1,54)	1,49(0,95-1,68)	1,28(1-1,47)	0,995
14D dosagem de ureia	48(24-61)	57,62(24-65)	39,79(28-48)	0,202

ANEXOS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Fatores microbiológicos da criptococose e sua importância na carga da doença em pacientes atendidos em um hospital de referência do Estado de São Paulo

Pesquisador: Lidianie de Oliveira

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 54949716.8.0000.5421

Instituição Proponente: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - FSP/USP

Patrocinador Principal: Instituto Adolfo Lutz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.454.981

Apresentação do Projeto:

A criptococose é responsável pelo número estimado de 1 milhão de casos de meningite no mundo e por 600 mil mortes por ano de pacientes com AIDS. *Cryptococcus neoformans* e *C. gatti* são os agentes mais comuns e nos últimos anos diferenças de suscetibilidade aos fármacos antifúngicos, anfotericina B (AMB) e fluconazol (FCZ), entre estas espécies são relatadas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral: Avaliar e compreender fenômenos biológicos de resistência a antifúngicos que possam explicar falha terapêutica ou recidiva da criptococose.

Objetivos específicos

1. Analisar fatores clínicos, laboratoriais e epidemiológicos conforme a evolução clínica de pacientes com criptococose;
 2. Descrever o transcriptoma de pares de isolados selecionadas, segundo espécie, suscetibilidade e heteroresistência ao FCZ e tolerância à AMB;
 3. Identificar fatores geneticamente determinados dos isolados, assim como, determinantes clínicos e epidemiológicos, relacionados com a falha terapêutica e a carga da doença causada pela criptococose.
- Para alcançar os objetivos propostos serão avaliados dois grupos de estudos de coorte, com coleta retrospectiva e prospectiva de informações. Serão analisados casos de criptococose de sistema

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, 715

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 01.246-904

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3061-7779

Fax: (11)3061-7779

E-mail: coop@fsp.usp.br

Continuação do Parecer: 2.454.981

nervoso

central, internados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER). Consistirá em coleta sistemática de dados clínicos e caracterização dos isolados obtidos das amostras biológicas.

Risco mínimo

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

É um estudo de relevância em Saúde Pública já que atinge uma população de pacientes imunodeprimidos com diagnóstico de AIDS

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

As pendências apontadas no parecer anterior foram atendidas

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos foram apresentados

Recomendações:

Aprovação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovação

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_941873 E1.pdf	01/11/2017 15:11:02		Aceito
Outros	Declaracao_de_Confidencialidade_e_utilizacao_de_informacoes_31out2017.pdf	01/11/2017 15:05:30	Lidiane de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Lidiane05abril2016.pdf	06/04/2016 23:27:03	Lidiane de Oliveira	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico /	acordo_cooperacao_utilizacao_cepas.pdf	17/03/2016 23:49:45	Lidiane de Oliveira	Aceito

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, 715

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 01.246-904

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3061-7779

Fax: (11)3061-7779

E-mail: coep@fsp.usp.br

USP - FACULDADE DE SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FSP/USP

Continuação do Parecer: 2.454.981

Biorepositório / Biobanco	acordo_cooperacao_utilizacao_cepas.pdf	17/03/2016 23:49:45	Lidiane de Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	cooperacao_Jose_IIERjan2016.pdf	17/03/2016 23:46:54	Lidiane de Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Documento_Renata.pdf	17/03/2016 23:45:47	Lidiane de Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Lidiane_de_Oliveira_Projeto_doutorado_22setembro2015.pdf	17/03/2016 23:29:00	Lidiane de Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto17mar2016plataforma.pdf	17/03/2016 23:21:16	Lidiane de Oliveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 22 de Dezembro de 2017

Assinado por:
Maria Regina Alves Cardoso
(Coordenador)

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, 715

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 01.246-904

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3061-7779

Fax: (11)3061-7779

E-mail: coop@fsp.usp.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Fatores microbiológicos da criptococose e sua importância na carga da doença em pacientes atendidos em um hospital de referência do Estado de São Paulo

Pesquisador: Lidiane de Oliveira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 54949716.8.3001.0059

Instituição Proponente: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - FSP/USP

Patrocinador Principal: Instituto Adolfo Lutz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.282.441

Apresentação do Projeto:

A análise prévia da documentação constatou os documentos a seguir.

1. Comprovante de envio do projeto – Plataforma Brasil.
2. Folha de rosto preenchida e assinada.
3. Três acordos de cooperação parcialmente assinados.
4. Resumo do Projeto.
5. Projeto.
6. TCLE.

O projeto apresentado discorre sobre a importância da Criptococose, agente causal de um milhão de casos de meningite por ano e uma letalidade de 60%. No Brasil a doença não é de notificação compulsória o que dificulta as estimativas. Em pacientes com AIDS as taxas de mortalidade variam de 45 a 65%. Verificou-se nos anos recentes relatos de diferença de sensibilidade aos fármacos antifúngicos Anfotericina B (AMB) e Fluconazol (FCZ). As bases moleculares envolvendo mecanismo de resistência destes antifúngicos ainda são desconhecidas, aliando-se a isto verifica-se a necessidade de conhecer os genes e as rotas regulatórias envolvidas. Trata-se de um projeto de doutorado de aluna da Faculdade de Saúde Pública da USP.

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Teve-se o entendimento que o estudo retrospectivo e prospectivo utilizará dados de 70 pacientes internados (dados publicados/monografia) e 30 novos casos internados (julho de 2015-junho de 2016) sem tratamento para doença. As amostras serão preservadas e posteriormente analisadas utilizando metodologia de biologia molecular para análise dos perfis de resistência (Curva de morte).

Objetivo da Pesquisa:**Objetivo primário**

Avaliar e compreender os fenômenos biológicos de resistência a antifúngicos que possam explicar falha terapêutica ou recidiva da Criptococose.

Objetivos secundários

- Analisar fatores clínicos, laboratoriais e epidemiológicos conforme a evolução clínica dos pacientes com criptococose.
- Descrever de pares isolados selecionados segundo: espécie, suscetibilidade e heterorresistência ao FCZ e tolerância à AMB.
- Identificar fatores geneticamente determinados dos isolados, assim como, determinantes clínicos e epidemiológicos relacionados com a falha terapêutica e a carga da doença causada pela criptococose.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os autores declaram não haver riscos maiores do que aqueles já envolvidos nos procedimentos de diagnóstico da doença. Serão utilizados dados de prontuários, e existe a garantia de sigilo das informações dos participantes da pesquisa. A pesquisa não propicia benefícios diretos aos participantes, no entanto poderá contribuir para, no futuro, melhorar o diagnóstico, prognóstico e tratamento da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Quanto ao mérito, o estudo justifica-se devido a magnitude e transcendência do problema, aliado às perspectivas da contribuição para uma futura melhoria do prognóstico e tratamento da doença.

Considerações éticas

O estudo envolve 100 seres humanos portadores de alguma patologia que necessitam de atendimento médico-hospitalar. Desta forma uma reflexão ética é necessária pois envolve critérios

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90**Bairro:** Cerqueira César**CEP:** 01.246-902**UF:** SP**Município:** SAO PAULO**Telefone:** (11)3068-2859**Fax:** (11)3085-3505**E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 2.282.441

de inclusão e exclusão que de uma forma ou de outra afetarão a vida do paciente. Embora a conduta diagnóstica esteja implícita no motivo da internação (sinais, sintomas e suspeita clínica) os riscos a que serão submetidos não são triviais. Isto posto uma atenção especial no TCLE se faz mister.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O primeiro fato que merece correção são as datas de recrutamento pois estão desatualizadas em relação ao andamento do projeto. Em segundo lugar algumas modificações no TCLE são sugeridas em anexo para orientar uma revisão do termo de forma a adequá-lo às boas práticas da ética em pesquisa com seres humanos. Não se verificou a existência de autorização para acesso aos prontuários dos pacientes.

Recomendações:

Rever a redação do TCLE conforme sugestões apresentadas em documento anexo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Em primeira análise o parecer foi pendente com as solicitações abaixo.

1. Revisão do TCLE.
2. Atualização do cronograma de recrutamento de pacientes participantes da pesquisa.
3. Anexar termo de consentimento da instituição para utilização de prontuários.
4. Verificar as assinaturas faltantes nos termos de cooperação.

A aluna Lidiane de Oliveira teve conhecimento das pendências por meio de mensagem eletrônica do CEPIAL de 16 de março de 2017, após outras mensagens eletrônicas desde a submissão do protocolo terem sido direcionadas a Dra. Márcia de Souza Carvalho Melhem, pesquisadora do Instituto Adolfo Lutz, sobre o mesmo assunto. Em 05 de junho de 2017, a aluna Lidiane de Oliveira respondeu definitivamente ao CEPIAL como enunciado na íntegra abaixo.

"1- O TCLE inserido na Plataforma Brasil refere-se ao documento revisado em 2016.

2- Após a aprovação neste Comitê, comprometemo-nos a realizar as alterações necessárias no cronograma, de recrutamento de pacientes participante, a ser desenvolvido no Instituto de Infectologia Emilio Ribas-IIER.

3- Do mesmo modo comprometemo-nos a entrar com emenda sobre inclusão do IIER como Instituição Participante da pesquisa, para que dar prosseguimento às etapas, como coleta de dados de prontuários de pacientes participantes.

4- A assinatura faltante no Termo de Cooperação foi providenciada e o documento será anexado

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 2.282.441

após liberação do projeto de pesquisa na Plataforma Brasil."

O texto acima e entre aspas foi assinado por Lidiane de Oliveira e Márcia de Souza Carvalho Melhem.

A aluna Lidiane de Oliveira entregou ao CEPIAL a aprovação quanto ao mérito científico pelo Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz, corroborada pela diretoria geral da instituição: CTC 10-I/2016, de 14/03/2017.

O instrumento Plataforma Brasil não permite ao CEP da instituição coparticipante, no caso o CEPIAL, a indicação de situação de parecer "Pendente" e, é possível somente a adição de um documento como "Nota Técnica Manual"; isto posto, certas etapas do trâmite deste protocolo de pesquisa foram conduzidas por meio de mensagens eletrônicas.

Todos os documentos entregues ao CEPIAL pela aluna Lidiane de Oliveira estão arquivados em papel no comitê.

Protocolo de pesquisa aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

O protocolo de pesquisa, pela análise do conjunto dos documentos, foi considerado aprovado do ponto de vista ético à luz da Resolução CNS 466/2012 pelo colegiado do CEPIAL com base nas deliberações da reunião ordinária de junho de 2017.

O lapso temporal da data de emissão do parecer consubstanciado em relação à data de aprovação pelo colegiado deveu-se ao período passado com a apresentação e conferência dos documentos complementares.

Em conformidade com a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, o pesquisador responsável deverá cumprir o item transcrito integralmente a seguir.

XI - Do pesquisador responsável

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 2.282.441

aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa; b) elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; c) desenvolver o projeto conforme delineado; d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento; f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa; g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios deverão ser adicionados ao protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil para análise do CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_656398.pdf	06/04/2016 23:34:38		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Lidiane05abril2016.pdf	06/04/2016 23:27:03	Lidiane de Oliveira	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_656398.pdf	17/03/2016 23:56:49		Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	acordo_cooperacao_utilizacao_cepas.pdf	17/03/2016 23:49:45	Lidiane de Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	cooperacao_Jose_IIERjan2016.pdf	17/03/2016 23:46:54	Lidiane de Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Documento_Renata.pdf	17/03/2016 23:45:47	Lidiane de Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Lidiane_de_Oliveira_Projeto_doutorado_22setembro2015.pdf	17/03/2016 23:29:00	Lidiane de Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto17mar2016plataforma.pdf	17/03/2016 23:21:16	Lidiane de Oliveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 2.282.441

Não

SAO PAULO, 19 de Setembro de 2017

Assinado por:
Luz Marina Trujillo
(Coordenador)

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Fatores microbiológicos da criptococose e sua importância na carga da doença em pacientes atendidos em um hospital de referência do Estado de São Paulo

Pesquisador: JOSE ERNESTO VIDAL BERMUDEZ

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 54949716.8.2001.0061

Instituição Proponente: Instituto de Infectologia Emílio Ribas

Patrocinador Principal: Instituto Adolfo Lutz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.644.400

Apresentação do Projeto:

Introdução: A criptococose é responsável pelo número estimado de 1 milhão de casos de meningite no mundo e por 600 mil mortes por ano de pacientes com AIDS. *Cryptococcus neoformans* e *C. gatti* são os agentes mais comuns e nos últimos anos diferenças de suscetibilidade aos fármacos antifúngicos, anfotericina B (AMB) e fluconazol (FCZ), entre estas espécies são relatadas. No entanto, bases moleculares relacionadas à resistência a antifúngicos ainda estão por esclarecer. Além disso, os perfis de heterorresistência ao FCZ (LHF) e tolerância à AMB necessitam de estudos para maior conhecimento dos genes e rotas regulatórias relacionadas à sobrevivência destes agentes. Em consequência, o objetivo geral deste estudo é avaliar e compreender fenômenos de resistência a antifúngicos que possam explicar falha terapêutica e recidiva da criptococose.

Metodologia: Serão avaliadas coortes com coleta retrospectiva e prospectiva de dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos, de 100 casos de pacientes com criptococose internados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas, em São Paulo. Os respectivos isolados serão classificados quanto a espécie e aqueles que apresentarem altos níveis de LHF e tolerância a AMB serão analisados quanto aos perfis de expressão gênica que estejam relacionados a baixa suscetibilidade. **Resultados esperados:** Os resultados serão analisados e comparados às características clínicas, laboratoriais e epidemiológicas e poderão auxiliar na

Endereço: Avenida Dr. Arnaldo 165

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3896-1406

Fax: (11)3896-1406

E-mail: comiteetica@emilioribas.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 2.644.400

compreensão dos determinantes das formas letais e persistentes da criptococose e forneçam informações sobre a carga da doença. Do mesmo modo, a descrição de perfis de expressão de genes de resistência poderá elucidar processos adaptativos relacionados com a capacidade de progressão da doença durante terapia antifúngica. Metodologia Proposta: Para o desenvolvimento do estudo retrospectivo serão analisados casos de criptococose de 70 pacientes internados no IIER no período de setembro de 2004 a março de 2005 e janeiro de 2012 a dezembro de 2013. Estes dados se encontram parcialmente disponíveis em estudos anteriores (Pappalardo, 2009; Chagas Filho, 2014). Para o estudo prospectivo, está prevista a avaliação de 30 casos de criptococose de pacientes internados no período de um ano (julho de 2015 a junho de 2016), sem tratamento para a doença. Serão compilados os informações sociodemográficas, dados relativos a infecção e dados clínicos e laboratoriais. Os isolados obtidos das amostras biológicas serão submetidos a procedimentos de identificação e testes de suscetibilidade a AMB e FCZ no Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo sob supervisão da pesquisadora Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar e compreender fenômenos biológicos de resistência a antifúngicos que possam explicar falha terapêutica ou recidiva da criptococose.

Objetivo Secundário:

Analisar fatores clínicos, laboratoriais e epidemiológicos conforme a evolução clínica de pacientes com criptococose; Descrever o transcriptoma de pares de isolados selecionados, segundo espécie, suscetibilidade e heterorresistência ao FCZ e tolerância à AMB; Identificar fatores geneticamente determinados dos isolados, assim como, determinantes clínicos e epidemiológicos, relacionados com a falha terapêutica e a carga da doença causada pela criptococose.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Risco Mínimo. Os procedimentos desta pesquisa não trarão riscos à saúde dos pacientes, pois

Endereço: Avenida Dr. Arnaldo 165

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3896-1406

Fax: (11)3896-1406

E-mail: comiteetica@emilioribas.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 2.644.400

serão utilizados o isolado retirado da sua amostra de liquor, obtido segundo protocolo para o diagnóstico da infecção, e dados de prontuário. Todas as informações anotadas serão mantidas confidencialmente e sem identificação, em um computador, impedindo o risco de nomes e dados serem divulgados.

Benefícios:

A pesquisa não trará benefícios diretos aos pacientes participantes da pesquisa. Os benefícios previstos poderão ser estabelecidos a longo prazo, após a análise dos dados provenientes da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

É um estudo de relevância, visto que pretende avaliar e compreender fenômenos de resistência a antifúngicos que possam explicar falha terapêutica e recidiva da criptococose.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Faz uso de termo de Confidencialidade.

Termos obrigatórios apresentados.

Recomendações:

Vide Conclusões ou Pendências.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Em projeto completo:

- Corrigir cronograma de acordo com data de aprovação deste CEP.- foi MODIFICADO EM INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO. PORÉM, NÃO FOI MODIFICADO EM PROJETO COMPLETO. Este CEP irá acatar a modificação, mas recomenda que a alteração seja feita também em projeto completo.

Em TCLE:

- Incluir no cabeçalho nome do investigador principal na Instituição - PENDENCIA ATENDIDA.
- Inserir espaço para rubrica do participante e do pesquisador em todas as páginas.- PENDENCIA ATENDIDA.
- Em DESCONFORTOS E RISCOS E BENEFÍCIOS: Está descrito "Existe um risco mínimo para você ao aceitar participar desta pesquisa". Porém, o risco não é descrito. Esclarecer ao participante do que se trata este risco mínimo.- PENDENCIA ATENDIDA.
- Acrescentar local com nome e endereço completo onde as amostras serão processadas e/ou analisadas.- PENDENCIA ATENDIDA.

Endereço: Avenida Dr. Arnaldo 165

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3896-1406

Fax: (11)3896-1406

E-mail: comiteetica@emilioribas.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 2.644.400

- Descrever de forma mais clara que não será necessária nova coleta de material e que serão utilizados material de amostra já coletada previamente. Embora esta informação conste do texto, não está descrita de forma clara.- PENDENCIA ATENDIDA.

Considerações Finais a critério do CEP:

O pesquisador deverá entregar uma cópia do Parecer de Aprovação do CEP à Seção de Pesquisa e Trabalhos Científicos da Divisão Científica e aguardar o documento denominado "Autorização Para o Início do Estudo". O pesquisador principal deverá enviar a este CEP os relatórios parciais e do final do estudo, conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1058337.pdf	29/04/2018 23:52:52		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEcorrigido_IIER_27abril2018.pdf	29/04/2018 23:48:21	JOSE ERNESTO VIDAL BERMUDEZ	Aceito
Outros	Folha_de_rosto17mar2016plataforma.pdf	10/03/2018 17:56:07	JOSE ERNESTO VIDAL BERMUDEZ	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Lidiane_de_Oliveira_Projeto_Doutorado_enviado_iier16dez17.pdf	10/03/2018 17:52:11	JOSE ERNESTO VIDAL BERMUDEZ	Aceito
Outros	Aprovacao_conselho_tecnico_cientifico_IAL2016_Marcia_de_Souza_C_Melhem.pdf	10/03/2018 17:44:37	JOSE ERNESTO VIDAL BERMUDEZ	Aceito
Outros	Lidiane_de_Oliveira_FSP_USPPB_PAR_ECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_24_54981_E122dez2017.pdf	10/03/2018 17:29:26	JOSE ERNESTO VIDAL BERMUDEZ	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinada_iier_ial.pdf	10/03/2018 17:24:34	JOSE ERNESTO VIDAL BERMUDEZ	Aceito
Outros	Aprovacao_Assessoria_Cientifica_IIERdez2017.pdf	08/03/2018 18:03:27	JOSE ERNESTO VIDAL BERMUDEZ	Aceito
Outros	Declaracao_de_Confidencialidade_e_utilizacao_de_informacoes_31out2017.pdf	01/11/2017 15:05:30	Lidiane de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE_Lidiane05abril2016.pdf	06/04/2016 23:27:03	Lidiane de Oliveira	Aceito

Endereço: Avenida Dr. Arnaldo 165

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3896-1406

Fax: (11)3896-1406

E-mail: comiteetica@emilioribas.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 2.644.400

Ausência	TCLE_Lidiane05abril2016.pdf	06/04/2016 23:27:03	Lidiane de Oliveira	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	acordo_cooperacao_utilizacao_cepas.pdf	17/03/2016 23:49:45	Lidiane de Oliveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 09 de Maio de 2018

Assinado por:
TÂMARA NEWMAN LOBATO SOUZA
(Coordenador)

Endereço: Avenida Dr. Arnaldo 165

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3896-1406

Fax: (11)3896-1406

E-mail: comiteetica@emilioribas.sp.gov.br

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
INSTITUTO DE INFECTOLOGIA EMILIO RIBAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Av. Dr. ARNALDO, 165 – CERQUEIRA CÉSAR/SP - CEP 01246-900
Email.: comiteetica@emilioribas.sp.gov.br
TELEFONE: 3896-1406

Declaração de Confidencialidade e Utilização de Informações

1. Identificação dos membros do grupo de pesquisa:

Nome completo (sem abreviação)	CPF
Lidiane de Oliveira	324330198-00
Fredi Alexander Diaz Quijano	233875858-70
Marcia de Souza Carvalho Melhem	901842118-91
José Ernesto Vidal Bermudez	224524748-51
Renata Buccheri de Oliveira	129032528-66

2. Identificação da pesquisa:

- Título do Projeto: Fatores microbiológicos da criptococose e sua importância na carga da doença em pacientes atendidos em hospital de referência do Estado de São Paulo
- Instituição: **INSTITUTO DE INFECTOLOGIA EMILIO RIBAS (IIER)**
- Pesquisador Responsável: Lidiane de Oliveira

3. Declaração:

Nós, membros do grupo de pesquisa identificado acima, baseados nos itens III.3.i e III.3.t das Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos (Res CNS 466/12) e na Diretriz 12 das Diretrizes Éticas Internacionais para Pesquisas Biomédicas Envolvendo Seres Humanos (CIOMS/93), declaramos que:

- O acesso aos dados registrados em prontuários de pacientes ou em bases de dados para fins da pesquisa científica será feito somente após aprovação do projeto de pesquisa pelo CEP do IIER;
- O acesso aos dados será supervisionado por uma pessoa que esteja plenamente informada sobre as exigências de confiabilidade;
- Asseguraremos o compromisso com a privacidade e a confidencialidade dos dados utilizados, preservando integralmente o anonimato e a imagem do participante bem como a sua não estigmatização;
- Asseguraremos a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades, inclusive em termos de autoestima, de prestígio e/ou econômico-financeiro;
- O pesquisador responsável estabeleceu salvaguardas seguras para a confidencialidade dos dados de pesquisa. Os participantes envolvidos serão informados dos limites da habilidade do pesquisador em salvaguardar a confidencialidade e das possíveis consequências da quebra de confidencialidade, caso seja necessário;
- Os dados obtidos na pesquisa serão usados exclusivamente para a finalidade prevista no protocolo;
- Os dados obtidos na pesquisa somente serão utilizados para o projeto vinculado. Todo e qualquer outro uso que venha a ser planejado, será objeto de novo projeto de pesquisa, que será submetido à apreciação do CEP do IIER;
- Devido à impossibilidade de obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de todos os participantes, assinaremos esse Termo de Consentimento de Uso de Banco de Dados, para a salvaguarda de seus direitos.

São Paulo, 04 de julho de 2017.

Nome completo (por extenso)	Data	Assinatura
Renata Buccheri de Oliveira	05/07/17	
Lidiane de Oliveira	05/07/17	
Fredi Alexander Diaz Quijano	10/07/2017	
Marcia de Souza Carvalho Melhem	27/07/2017	
José Ernesto Vidal Bermudez	31/07/2017	

10 MANUSCRITO SUBMETIDO

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene
Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene

Manuscript Number: TRSTMH-D-19-00131

Early clinical and microbiological predictors of outcome in hospitalized patients with cryptococcal meningitis

Lidiane de Oliveira^{a*}, Marcia de Souza Carvalho Melhem^b, Renata Buccheri^c, Oscar José Chagas^c, José E. Vidal^{c, d}, Fredi Alexander Diaz-Quijano^a

^a Department of Epidemiology, School of Public Health, University of São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 715, São Paulo, SP, CEP 01246-904, Brazil;

^b Mycology Unit of Adolfo Lutz Institute, Public Health Reference Laboratory, Secretary of Health, Av. Dr. Arnaldo, 351, São Paulo, SP CEP 05411-000, Brazil

^c Department of Neurology, Emílio Ribas Institute of Infectious Diseases, Av. Dr. Arnaldo 165, São Paulo, SP, CEP 05411-000, Brazil

^d Department of Infectious Diseases, Faculty of Medicine, University of São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470, São Paulo, SP, CEP 01246-904, Brazil

*Corresponding author: Tel: +55 11 982362732; E-mail: lidiane.deoliveira@usp.br

ABSTRACT

Background: Cryptococcal meningitis causes high mortality in immunocompromised and immunocompetent patients. The objective of this study was to identify predictors of clinical outcome in patients with cryptococcal meningitis, available at the beginning of hospitalization.

Methods: It was analyzed 96 cases with clinical, epidemiological and laboratory data, and identification and antifungal susceptibility of the strains. Univariable and multiple analyses using logistic regression were performed to identify predictors of in-hospital mortality. Moreover, we performed a secondary analysis for a composed outcome defined by death, referral to the intensive care unit and relapse.

Results: The variables significantly associated with the death were age, the cerebrospinal fluid (CSF) yeasts count, and a variable composed of systemic arterial hypertension or diagnosis of cerebral edema or ventricular dilatation by tomography. At the secondary analysis, CSF yeast count was also associated with the outcome, in addition to the culture of *Cryptococcus* spp. from blood and neurotoxoplasmosis. The associations were consistent in survival models.

Conclusion: Variables available in the first days of hospitalization showed utility to predict the prognosis in patients with cryptococcal meningitis. These predictors can help to identify the cases with higher potential of death and that require the optimization of the therapeutic resources.

Keywords: *Cryptococcus*, Cryptococcosis, cryptococcal meningitis, predictors, prognosis, mortality

INTRODUCTION

Cryptococcosis is one of the major invasive diseases in humans. It is acquired by inhalation of fungal propagules, which can be deposited in the pulmonary alveoli or disseminate to cutaneous tissue, internal organs and to the central nervous system, where is observed the most severe clinical form ¹.

In people living with HIV/AIDS (PLWHA), cryptococcosis is one of the opportunistic AIDS-defining infections and one of the main causes of death in these patients ²⁻⁷. The *Cryptococcus* species associated with AIDS is almost exclusively *C. neoformans*. On the other hand, *C. gattii* infects apparently immunocompetent individuals, probably due to increased virulence ⁸⁻¹⁰.

The lethality rates varies and depends on several factors, among them: underlying disease, stage of diagnosis of the disease and therapeutic strategy. However, it remains the second most common cause of AIDS-related mortality, resulting in the death of an average of 15% of this population ¹¹. In developed countries, cryptococcosis presents lethality range from 9% to 20%, and this rate to developing countries is around 40% ^{7,12-15}.

Besides these factors, it is necessary to identify predictors of the prognosis, which may guide therapeutic alternatives. Consequently, the objective of this study was to identify predictors of clinical evolution in patients hospitalized with cryptococcal meningitis.

PATIENTS, MATERIALS, AND METHODS

Study design and population

The study consisted of a retrospective cohort study, with data collection of first episodes of cryptococcal meningitis, from patients admitted at the Emílio Ribas Institute of Infectious Diseases of São Paulo (ERIID) from August 2012 to December 2013 and January 2015 to August 2017. The ERIID is a public tertiary hospital and main reference for the treatment of infectious diseases in the state of São Paulo and Latin America.

Data collection and clinical information

Demographic, clinical, and laboratory data were obtained from medical records. The variables evaluated included sex, age, duration of hospital stay, Glasgow coma scale, signs and symptoms of cryptococcosis at admission, antifungal therapy, information about HIV-infection, antiretroviral therapy, viral load, CD4 values and occurrence of other infectious diseases or comorbidities.

The results of laboratory tests of cerebrospinal fluid (CSF) used were: opening pressure during the lumbar puncture, *Cryptococcus* spp. antigen, culture, India ink test, yeast count using a validated technique at ERIID¹⁶, glucose and protein dosage, and global and differential cell counts. Results of blood urea and creatinine level were also collected. All these results were referring to admission or the first days of hospitalization. It was recorded results of computerized tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI) of the skull.

Identification and antifungal susceptibility profile of strains

The first strain obtained from each case was sent and identified in Mycology Unit of Adolfo Lutz Institute of São Paulo, using classic methods¹⁷. All strains were genotyped by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP), by the amplification of the *URA5* gene followed by the treatment with enzymes *Sal* 96I and *Hha*I¹⁸.

The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the broth microdilution described in E. Def. 7.3.1 of AFST-EUCAST¹⁹ against fluconazole (FCZ) and Etest® strips (bioMérieux, France) for amphotericin B (AMB), following manufacturer's instructions. To interpret the results, breakpoints adopted in previous studies and clinically relevant were used: MIC <8mg/L and resistant MIC ≥16mg/L for FCZ and MIC <1mg/L and resistant MIC >2mg/L for AMB^{20–22}. The quality control strains *C. krusei* ATCC 6258 and *C. parapsilosis* ATCC 22019 and the *C. neoformans* H99 and *C. gattii* R265 were used in all tests.

Tests were also performed to determine the level of heteroresistance to FCZ (LHF)²³ and the time to fungicide activity (Time-kill, [TK]) of 1 mg/L of AMB^{3,24}.

Statistical analysis

It was performed an analysis to identify predictors of in-hospital mortality and one secondary analysis of a composed outcome. This last was defined by the occurrence of any of the following events: in-hospital death, or the intensive care unit (ICU) referral during hospitalization or cryptococcosis relapse six months after hospital discharge. The univariable analysis of categorical and quantitative variables was performed using Fisher's Exact Test and Wilcoxon-Mann-Whitney Test, respectively, and that presented a p-value ≤0.2 were selected to the multiple analysis.

To avoid collinearity between the quantitative variables, the Pearson correlation coefficient was calculated and, among variables strongly correlated ($r > 0.6$), the one with the highest association with the outcome was chosen. Consequently, the Glasgow scale was excluded from subsequent analyzes since it was strongly correlated with age.

Quantitative variables were analyzed regarding a possible linear relation with the outcome. Thus, the possibility of applying a transformation or defining cutoff points was explored. For this, the variables were categorized into deciles and then evaluated to about the odds of mortality.

The variables were evaluated by the logistic regression, maintaining for the multiple analyzes only those significantly associated with the outcome ($p \leq 0.05$). The antifungal susceptibility profile and genotypes of the strains and the antifungal therapy were also evaluated in the multiple analyzes, independently of the univariable results.

The goodness of fit was evaluated by the Pearson test and the Hosmer-Lemeshow test. The predicted values were used to elaborate the receiver operating characteristic (ROC) curves, and the accuracy of the model was calculated for the cutoff of 0.5. It was evaluated whether the associations were maintained by excluding the outliers (upper values three times the average of the leverage) and influential observations (with delta-deviance higher than cutoff point of 4)²⁵.

Cox regression was performed to analyze whether these predictors were associated with time to the outcome and the Kaplan-Meier curves were obtained to represent graphically the survival time from

the date of hospitalization to the occurrence of the outcomes. For this analysis, the patients who survived were censored on the day of hospital discharge and for the secondary analysis, patients who did not present one of the events were censored 180 days (6 months) after discharge.

All analyses were performed using the Stata® program (version 11.0, Stata Corp. LP, College Station, TX, USA).

RESULTS

Clinical and laboratory information

We analyzed 96 cases of cryptococcal meningitis in patients aged from 19 to 68 years old and the majority of male (74/96;77.08%). The duration of hospital stay ranged from 1 to 202 days with a median of 38 days and an interquartile range (IQR) of 23-54, and ICU referral occurred in 27 (30%) patients, with a stay period of 1 to 48 days and median of 7 days in this unit. Hospital death occurred in 25 patients (25/93, 26.9%) and the period that they remained hospitalized ranged from 1 to 202 days with a median of 23 days until the death. Relapse in up to 6 months was reported in 16 patients (16/93,17.2%).

HIV-infection was described at 96,7% (87/90) of patients with viral load from undetectable to 3,436,979 copies/mL of blood (median 104,126, IQR 1824-332,156 copies/mL). Undetectable load (<50 copies/mL) was observed to 8 patients. CD4 values ranged from 2 to 722 cells/mm³ (median 42, IQR 16-78 cells/mm³). Moreover, one or more comorbidities were recorded during the hospitalization of 27 (30%) patients, among them, the most frequent were: viral hepatitis infection (11/90,12.2%), Kaposi's sarcoma (7/90;7.8%) and systemic arterial hypertension (SAH) (6/90,6.7%). Other infections were diagnosed to 58.8% (53/90) of patients and the most frequently were oral/esophageal candidiasis (22.1%), pulmonary tuberculosis (16.7%) and cytomegalovirus infection (12.3%).

The CSF opening pressure was recorded in 69 (76.7%) patients and the value ranged from 8 to 150 cmH₂O. Intracranial hypertension (opening CSF pressure >20cmH₂O) was observed in 54 (78.6%) patients. The CSF yeast count presented values ranging from 0 to 11,520 yeast/mm³ (median 192 yeast/mm³). Cultures of *Cryptococcus* from samples of extra-neural sites were observed in 20 (22.5%) patients, including 18 from bloodstream, three from the skin, one from lymph nodes and one from lungs.

Combination therapy of AMB-FCZ was used in 42.9% (42/89) of patients, AMB-flucytosine in 50.6% (45/89) and therapy with only AMB was prescribed for two (2.3%) patients.

Identification and antifungal susceptibility profile of strains

It was identified 93 *C. neoformans*, and these, 76 (81.7%,76/93) were of the genotypes VNI and 17 VNII (18.3%, 17/93) and three strains of *C. gattii* VGII.

The AMB-MIC varied from 0.012 mg/mL to 0.94 mg/L, and resistance were not observed. The FCZ-MIC was 0.12 mg/L to 64 mg/L and 28.1% of strains (27/96) were FCZ-resistant (MIC_≥16mg/L).

LHF values ranged from 16 to 128mg/L, in which 9,4% of strains with LHF 16mg/L (9/96), 53,1% with 32mg/L (51/96), 32,3% with 64mg/L (31/96) and 5,2% (5/96) with LHF 128mg/L.

Fungicidal activity of AMB at TK6 was observed to 20.8% (20/96), at TK12 to 19.8% (19/96), at TK24 to 23.9% (23/96), at TK48 to 17.7% (17/96) and at TK72 to 11.5% (11/96) of the strains. No fungicidal activity was observed in 6.2% of the strains (6/96).

Predictors of mortality

In the univariable analysis, the following variables were associated with in-hospital mortality: age, Glasgow coma scale, torpors state, SAH, pneumonia, the culture of *Cryptococcus* spp. of extra-neural site, CSF yeasts count, urea level and diagnosis of cerebral edema and ventricular dilation by CT (Table 1).

Quantitative variables were analyzed regarding a possible linear relation with the outcome. Thus, the possibility of applying a transformation or defining cutoff points was explored. For this, the variables were categorized into deciles and then evaluated to about the odds of mortality.

The categorization of the variables to the evaluation of the odds mortality (Figure 1) showed that only the urea level was categorized since presented the stabilization of odds at 40mg/dL (deciles nine and ten at Figure 1D).

The CSF yeast count was transformed to a logarithm version. However, a unit was added to all observations before transforming into logarithm, to avoid losses related to the natural logarithm of 0. This variable, hereafter named as "CSF yeast count-log", had a higher association with the outcome than the original version.

The variables of SAH, cerebral edema and ventricular dilation by CT were unified, due to the low number of observations and because most of the observations were from patients who died (10/13). This variable was defined by "SAH and neurological impairment by computed tomography" (SAH/NICT).

The variables significantly associated with death in the multiple analysis were: age, CSF yeast countlog, and SAH/NICT (Table 2). The antifungal susceptibility profile, the genotypes strains, and antifungal therapy were not associated with mortality in this model.

The model showed an area under the ROC curve of 91.6% (95% Confidence Interval [95%CI]: 85.8-97.5%, Figure 2) and presented the accuracy of 83.3%. The sensitivity and specificity were 54.5% and 92.6%, respectively (positive predictive value=70.6%, negative predictive value=86.3%). The model presented goodness of fit at the Pearson test and at the Hosmer-Lemeshow test with $p=0.96$ and 0.99 , respectively.

By excluding the extreme and influential observations, the associations with the outcome were maintained (see Supplementary Figure S1, Table S1, and S2).

The categorical variable of urea level was associated with the outcome (Odds Ratio [OR]=6.16, 95%CI=1.31-29.00, $p=0.02$), however, its inclusion resulted in the loss of precision due to the increase at the standard error of other estimates, such as SAH/NICT (95%CI increased to 6.30-482.27). Also, the number of observations for this variable was lower ($n=83$), and the goodness of fit decreased (Hosmer-Lemeshow $p=0.21$). For these reasons, it was not maintained at the model.

The associations were consistent at Cox regression, in which the following variables were associated with the time to event: SAH/NICT (HR=3.18, 95%CI=1.11-1.70, $p=0.01$), CSF yeast count-log (HR=1.37, 95%CI=1.28-7.87, $p=0.003$) and age in years (HR=1.05, 95%CI=1.00-1.09, $p=0.02$).

For the representation with Kaplan-Meier curves the quantitative variables were categorized according to the respective medians (i. e. 38 years for age and 200 yeasts/mm³ for CSF yeast count). Since the curves did not intersect, it was assumed that the proportionality of the risks was maintained throughout the time of hospitalization (Figure 3). A similar result was observed in survival curves adjusted (see Supplementary Figure S2).

The survival probability on the 50th day of hospitalization was: 90% for patients younger than 38 years old versus 73% for ≥ 38 years (Figure 3A), 97% for those with ≤ 199 yeast/mm³ of *Cryptococcus* spp. in CSF and 69% for the group with ≥ 200 yeasts/mm³ (Figure 3B) and 87% for patients who did not present one of the events described in SAH/NICT and 51% for patients for who presented (Figure 3C).

Secondary analysis - predictors of composed outcome

The variables that presented significant statistical difference were: Glasgow scale, positive blood culture for *Cryptococcus* spp., neurotoxoplasmosis, pneumonia, CSF count of both yeasts and macrophages (Table 3).

At the multiple model, the CSF yeast count-log (OR=1.50, 95%CI=1.20-1.86, $p<0.001$) and neurotoxoplasmosis (OR=18.62, 95%CI=1.85-187.5, $p=0.01$) were associated with the composed outcome. Positive blood culture for *Cryptococcus* spp. presented a high risk of the outcome, but without statistical significance (OR=3.30, 95%CI=0.86-12.59, $p=0.08$), however, it was kept because its inclusion improved the precision of the estimates. This model showed the area under the ROC curve of 83.2% (95%CI=74.54-91.77). The accuracy was 74.2%, with a sensitivity of 80% and specificity of 68.2% (positive predictive value 72%, negative predictive value 76.9%). This model showed the goodness of fit with $p=0.73$ and $p=0.23$ to the Pearson and the Hosmer-Lemeshow test, respectively.

The increase of one unit at the log of CSF yeasts count-log was associated with an increase of 34% in the hazard in the Cox regression model (Hazard ratio [HR]=1.34, 95%CI=1.16-1.56, $p<0.001$).

The culture of *Cryptococcus* spp. exhibited an association with an HR of 2.1 in the same model (95% CI: 1.09-4.04, $p=0.03$). Although the diagnosis of neurotoxoplasmosis showed a similar point estimate but with lower precision (HR=2.12, 95% CI=0.97-4.62, $p=0.06$).

The patients who had CSF yeast count ≥ 200 yeasts/mm³, the positive blood culture for *Cryptococcus* spp. or neurotoxoplasmosis presented lower survival time related to the occurrence of one of the events of the composed outcome (Figure 4).

DISCUSSION

We studied a cohort of patients suffering cryptococcal meningitis, which were predominantly from PLWHA and, as in other studies, the majority were males, also reflecting the population most affected by the AIDS epidemic²⁶⁻³². The in-hospital mortality observed was 26.9% and, according to other Brazilian studies, this rate may vary from 25 to 74%, especially in the first weeks of therapy FCZ primary prophylaxis should be used in some epidemiological settings^{4,30,33-37}.

At the Americas, the etiologic agents of cryptococcal meningitis are, in their vast majority, *C. neoformans*, also confirmed in this series of patients^{4,30,37-42}. Of the 3 cases of *C. gattii* infection, 2 were HIV negative, and among them, one of them was diagnosed with primary immunodeficiency. It is postulated that *C. gattii* shows greater virulence when compared to *C. neoformans*, which could justify that individuals without apparent immunosuppression can be infected by this species. However, other factors may be associated with and interfere with the immune response of patients, such as age and the presence of other comorbidities^{38,43-45}. As described in studies conducted in the Americas, the genotype VNI overtake the others at this study, and among *C. gattii*, the genotype was exclusively VGII⁴⁶.

The clinical manifestations associated with death were seizures, mental confusion and torpors state, and are consistent with the literature^{4,47,48}. The presence of neurological disorders, such as papilledema, optic nerve atrophy and seizures are risk factors for death and of the occurrence of neurological sequelae within 12 months⁴⁹. Seizures and altered mental status were also associated statistically with the death of patients with cryptococcal meningitis in up to 2 weeks¹³.

The multiple analysis revealed important variables potentially available in the first week of hospitalization, including age, yeast count in the CSF, SAH, and neurological pathologies diagnosed by CT. The survival analysis indicated that these variables were consistent predictors of time to death, even when adjusted. The Cox regression indicated that these variables maintained the associations, even after exclusion of influential observations and outliers. In the secondary analysis, CSF yeast count, positive blood culture for *Cryptococcus* spp. and neurotoxoplasmosis were associated with the composed outcome. All these associations were consistent in the survival models.

The age was significantly associated with in-hospital death, and this result also observed at the multiple analysis confirming that the age can be a risk factor for death in these patients^{27,50,51}. A study performed at Taiwan observed that age >60 years was a predictor of poor prognosis²⁷. Another research with cryptococcal meningitis patients showed age >50 years independently associated with death within two weeks¹³. Therefore, our study is consistent with these associations and we also suggest that age exhibited a biological gradient since the increase in years was progressively associated with the odds of death.

The fungal burden, measured by the CSF yeast count, showed to be a consistent predictor of both death and the composed outcome. Other studies have also shown this variable associated with therapeutic failure and death^{4,13,16,52-54}. The presence of a high number of *Cryptococcus* spp. yeasts at CSF contributes to increasing intracranial pressure, it being a mechanism proposed to the mechanical obstruction of CSF flow^{55,56}. Probably thick capsules and giant cells also contribute to increased intracranial pressure^{57,58}. Although there was no difference between the increase in intracranial pressure and death in this study, there was a trend of a greater number of cases of this variable related to death, as reported in the literature^{7,59-61}. Probably due to the sample size, it was not possible to estimate this association with precision.

The presence of *Cryptococcus* spp. antigen in CSF was not associated with outcomes, suggesting that serum or CSF antigen dosage cannot be considered a predictive factor for failure to treat or relapse of cryptococcosis⁷. However, the dissemination of cryptococcosis, identified by the culture

of extra-neural sites, was associated with outcomes. In our analysis, the presence of *Cryptococcus* spp. in blood was and predictor of poor clinical outcome^{51,60,62,63}.

The CD4 <200 cells/mm³ was not associated with poor clinical outcome at our study. However, it is known that when a variable present low variability or values predominantly reduced, as in this case, the capacity of discrimination is reduced, which could explain the lack of association of this variable with the outcomes. The CD4 <200 cells/mm³ values presented high mortality and dissemination of cryptococcosis risk and, in these cases, cryptococcal antigen screening followed by pre-emptive therapy is the preferred approach. Nevertheless, where cryptococcal antigen testing is not available, FCZ primary prophylaxis should be used in some epidemiological settings^{7,62,64}.

All patients were treated with AMB during the therapy induction and the combined therapy was administered in almost all patients. According to recommendations, AMB-combination is the most appropriate therapy for cryptococcal meningitis⁷. Due to the partial availability of flucytosine at the hospital, this drug was given to more than half of them and FCZ-AMB occurred in a lower proportion. In this study, in contrast to current recommendations⁷, the use of flucytosine or FCZ as a second drug was not associated with the outcomes. This fact probably indicates the multiplicity of intervening factors in this uncontrolled observational study.

The indicators of antifungal susceptibility were not associated with outcomes. Currently, the determination of AMB-MIC and FCZ-MIC is not recommended at the hospital routine, since the correlation between these results and the clinical response remains uncertain. In addition, the determination of clinical breakpoints for *Cryptococcus* spp. remains non-existent due to the absence of studies correlating MIC or other susceptibility measures with the clinical prognosis^{20–22,51,65,66}. All strains presented FCZ-heteroresistant clones however, the LHF was not associated with the severity of cryptococcal meningitis. The LHF was the same to strains from patient with first episode of cryptococcosis and to another with relapsed strains⁶⁷. On the other hand, researchers observed distinct LHF at FCZ-resistant and susceptible strains and higher FCZ-MIC at respective heteroresistant clones⁶⁸. Likewise, the fungicidal activity of AMB showed no association with outcomes. The same result was also described by another study³. Conversely, researchers observed association of AMB-tolerant strains and the death^{65,69}. Possibly the sample size can be responsible by absence of association in our study.

The urea level can be a potential predictor of prognosis, however, due to the reduced number of the observations, when this variable was included in multiple analysis we observed a decrease for associations. This parameter can act as a nephrological damage indicator or a mediator of the risk factor for death.

The sample size was a limiting factor that may have affected the precision of estimations. Despite this, associations were consistent among the models evaluated including those with binary and time-to-event outcomes. Moreover, the association were coherent with the expected according to the literature. For this reason, it is plausible that the associations observed to be extrapolated to other populations.

In conclusion, we identified clinical factors observed in the first days of hospitalization able to predict the prognosis of cryptococcosis in a predominantly PLWHA. Thus, a simple model allowed to predict death with high accuracy. In addition, the associations remained consistent when evaluated in survival analyses. Among the variables, the CSF yeast count was a consistent predictor of death and severity. Although it is recommendable to evaluate these variables in other populations, we expected that the predictors identified allow optimizing the treatment of these patients and reducing their mortality.

Acknowledgments: We thank Marilena dos Anjos Martins and Jefferson Sabino Rodrigues for the collaboration in the molecular genotyping tests and Maria Walderez Szeszs, Lucas Xavier Bonfietti and Mirian Rando Araujo for helping with the antifungal susceptibility tests.

Authors' contributions: LO conceived the study, participated in its design, performed the laboratory experiments with the strains, the collect of the clinical and laboratory data from medical records, created the database, carried out the database and its interpretation and prepared the first draft of the manuscript. RB e OJC performed the clinical and laboratory data collect from medical records and contributed to the database elaboration. MSCM participated in design study, supported in development and interpretation of the antifungal susceptibility tests. JEV collaborate to collect the clinical data from medical records, FADQ participated in its design and coordination of the study, carried out the data analysis and collaborate with prepared of the manuscript. All autor participate at the study implementation and contributed to editing and revision of the final version of the manuscript.

Funding: LO was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for this study (Process number: 165381/2015-9).

Conflict of Interest: The authors report no conflict of interest.

Ethical approval: The consent statement was not applicable for this study as data were retrospectively collected. This study was approved by Research Ethics Committees of the School of Public Health of the University of São Paulo (Certificate of Presentation for Ethical Appreciation: 54949716.8.0000.5421), Adolfo Lutz Institute (Certificate of Presentation for Ethical Appreciation: 54949716.8.3001.0059) and of Emílio Ribas Institute of Infectious Diseases (Certificate of Presentation for Ethical Appreciation: 54949716.8.2001.0061).

REFERENCES

1. Lin X, Heitman J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. *Annual Review of Microbiology*. 2006;60(1):69-105. doi:10.1146/annurev.micro.60.080805.142102
2. Valle LD. HIV disorders of the brain; pathology and pathogenesis. *Frontiers in Bioscience*. 2006;11(1):718. doi:10.2741/1830
3. Pappalardo MCSM, Szeszs MW, Martins MA, et al. Susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B using time–kill methodology. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2009;64(2):146-151. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2009.02.007
4. Mora DJ, da Cunha Colombo ER, Ferreira-Paim K, Andrade-Silva LE, Nascentes GAN, Silva-Vergara ML. Clinical, Epidemiological and Outcome Features of Patients with Cryptococcosis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Mycopathologia*. 2012;173(5-6):321-327. doi:10.1007/s11046-011-9504-9
5. Domingues C-SB, Waldman EA. Causes of Death among People Living with AIDS in the Pre- and Post-HAART Eras in the City of São Paulo, Brazil. Vermund SH, ed. *PLoS ONE*. 2014;9(12):e114661. doi:10.1371/journal.pone.0114661
6. Opintan JA, Awadzi BK, Biney IJK, et al. High rates of cerebral toxoplasmosis in HIV patients presenting with meningitis in Accra, Ghana. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2017;111(10):464-471. doi:10.1093/trstmh/trx083
7. World Health Organization. *Guidelines on the Diagnosis, Prevention and Management of Cryptococcal Disease in HIV-Infected Adults, Adolescents and Children: Supplement to the 2016 Consolidated Guidelines on the Use of Antiretroviral Drugs for Treating and Preventing HIV Infection*. Geneva; 2018.
8. Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Journal of clinical microbiology*. 1990;28(7):1642–1644.
9. Montenegro H, Paula CR. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. *Medical Mycology*. 2000;6.
10. Ngamskulrungron P, Meyer W. Melanin production at 37°C is linked to the high virulent *Cryptococcus gattii* Vancouver Island outbreak genotype VGIIa. *Australasian Mycologist*. 2009;28:9-14.
11. Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2017;17(8):873-881. doi:10.1016/S1473-3099(17)30243-8
12. Corbett EL, Churchyard GJ, Charalambos S, et al. Morbidity and Mortality in South African Gold Miners: Impact of Untreated Disease Due to Human Immunodeficiency Virus. *Clinical Infectious Diseases*. 2002;34(9):1251-1258. doi:10.1086/339540
13. Jarvis JN, Bicanic T, Loyse A, et al. Determinants of Mortality in a Combined Cohort of 501 Patients With HIV-Associated Cryptococcal Meningitis: Implications for Improving Outcomes. *Clinical Infectious Diseases*. 2014;58(5):736-745. doi:10.1093/cid/cit794
14. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS: *AIDS*. 2009;23(4):525-530. doi:10.1097/QAD.0b013e328322ffac
15. Pyrgos V, Seitz AE, Steiner CA, Prevots DR, Williamson PR. Epidemiology of Cryptococcal Meningitis in the US: 1997–2009. Arez AP, ed. *PLoS ONE*. 2013;8(2):e56269. doi:10.1371/journal.pone.0056269
16. Vidal JE, Gerhardt J, Peixoto de Miranda ÉJ, et al. Role of quantitative CSF microscopy to predict culture status and outcome in HIV-associated cryptococcal meningitis in a Brazilian cohort. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2012;73(1):68-73. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.01.014
17. Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T. *The Yeasts*. 5 Edition. Oxford, UK: Elsevier Science; 2011.
18. Meyer W, Castañeda A, Jackson S, et al. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerging infectious diseases*. 2003;9(2):189.

19. Arendrup MC, Guinea J, Cuenca-Estrella M, et al. EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 7.3. 2015:21.
20. Aller AI, Martin-Mazuelos E, Lozano F, et al. Correlation of Fluconazole MICs with Clinical Outcome in Cryptococcal Infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(6):1544-1548. doi:10.1128/AAC.44.6.1544-1548.2000
21. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, et al. Global Trends in the Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). *Journal of Clinical Microbiology.* 2005;43(5):2163-2167. doi:10.1128/JCM.43.5.2163-2167.2005
22. Dannaoui E, Abdul M, Arpin M, et al. Results Obtained with Various Antifungal Susceptibility Testing Methods Do Not Predict Early Clinical Outcome in Patients with Cryptococcosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2006;50(7):2464-2470. doi:10.1128/AAC.01520-05
23. Sionov E, Chang YC, Garraffo HM, Kwon-Chung KJ. Heteroresistance to Fluconazole in *Cryptococcus neoformans* Is Intrinsic and Associated with Virulence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2009;53(7):2804-2815. doi:10.1128/AAC.00295-09
24. Klepser ME, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller MA. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1998;42(5):1207-1212.
25. Hoffmann JP. *Regression Models for Categorical, Count, and Related Variables : An Applied Approach.* Oakland: University of California Press; 2016.
26. Mdodo R, Moser SA, Jaoko W, et al. Antifungal susceptibilities of *Cryptococcus neoformans* cerebrospinal fluid isolates from AIDS patients in Kenya. *Mycoses.* 2011;54(5):e438-442. doi:10.1111/j.1439-0507.2010.01946.x
27. Lee C-H, Chang T-Y, Liu J-W, et al. Correlation of anti-fungal susceptibility with clinical outcomes in patients with cryptococcal meningitis. *BMC infectious diseases.* 2012;12(1):361.
28. Agudelo CA, Muñoz C, Ramírez A, et al. Response to therapy in patients with cryptococcosis and AIDS: Association with in vitro susceptibility to fluconazole. *Revista Iberoamericana de Micología.* 2015;32(4):214-220. doi:10.1016/j.riam.2014.07.006
29. Chen Y-C, Chang T-Y, Liu J-W, et al. Increasing trend of fluconazole-non-susceptible *Cryptococcus neoformans* in patients with invasive cryptococcosis: a 12-year longitudinal study. *BMC Infectious Diseases.* 2015;15(1). doi:10.1186/s12879-015-1023-8
30. Aguiar PADF de, Pedroso R dos S, Borges AS, Moreira T de A, Araújo LB de, Röder DVD de B. The epidemiology of cryptococcosis and the characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated in a Brazilian University Hospital. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.* 2017;59(0). doi:10.1590/s1678-9946201759013
31. Arechavala A, Negroni R, Messina F, et al. Cryptococcosis in an Infectious Diseases Hospital of Buenos Aires, Argentina. Revision of 2041 cases: Diagnosis, clinical features and therapeutics. *Revista Iberoamericana de Micología.* 2018;35(1):1-10. doi:10.1016/j.riam.2017.04.003
32. Shaheen AA, Somayaji R, Myers R, Mody CH. Epidemiology and trends of cryptococcosis in the United States from 2000 to 2007: A population-based study. *International Journal of STD & AIDS.* 2018;29(5):453-460. doi:10.1177/0956462417732649
33. Moreira T de A, Ferreira MS, Ribas RM, Borges AS. Criptococose: estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2006;39(3):255-258. doi:10.1590/S0037-86822006000300005
34. Silva PR da, Rabelo RA de S, Terra APS, Teixeira DNS. Susceptibility to antifungal agents among *Cryptococcus neoformans* varieties isolated from patients at a university hospital. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2008;41(2):158-162.
35. Mascarenhas-Batista AV, Mascarenhas Souza N, Sacramento E. FATORES PROGNÓSTICOS NA MENINGITE CRIPTOCÓCICA EM HOSPITAL DE REFERÊNCIA PARA DOENÇAS INFECCIOSAS. *Revista Baiana de Saúde Pública.* 2013;37:68. doi:10.22278/2318-2660.2013.v37.n0.a591
36. Azambuja AZ de, Wissmann Neto G, Watte G, Antonioli L, Goldani LZ. Cryptococcal Meningitis: A Retrospective Cohort of a Brazilian Reference Hospital in the Post-HAART Era of Universal Access. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology.* 2018;2018:1-5. doi:10.1155/2018/6512468

37. Nunes J de O, Tsujisaki RA de S, Nunes M de O, et al. Cryptococcal meningitis epidemiology: 17 years of experience in a State of the Brazilian Pantanal. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2018;51(4):485-492. doi:10.1590/0037-8682-0050-2018
38. Oliveira RV, Trilles L, Lázera M dos S, et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103(5):455-462.
39. Freire AKL, dos Santos Bentes A, de Lima Sampaio I, et al. Molecular characterisation of the causative agents of Cryptococcosis in patients of a tertiary healthcare facility in the state of Amazonas-Brazil: Cryptococcosis in the state of Amazonas-Brazil. *Mycoses*. 2012;55(3):e145-e150. doi:10.1111/j.1439-0507.2012.02173.x
40. Matos CS, Souza Andrade A, Oliveira NS, Barros TF. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus* spp. in Bahia, Brazil: molecular types and antifungal susceptibilities. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2012;31(7):1647-1652. doi:10.1007/s10096-011-1488-3
41. Andrade-Silva L, Ferreira-Paim K, Mora DJ, et al. Susceptibility profile of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Medical Mycology*. 2013;51(6):635-640. doi:10.3109/13693786.2012.761737
42. Wirth F, Azevedo MI, Goldani LZ. Molecular types of *Cryptococcus* species isolated from patients with cryptococcal meningitis in a Brazilian tertiary care hospital. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. November 2018. doi:10.1016/j.bjid.2018.11.002
43. Paula CR, Domingues-Ferreira M, Soares MCP, et al. *Cryptococcus gattii*: immunological and microbiological study in a patient with neurocryptococcosis. *JMM Case Reports*. 2015;2(5). doi:10.1099/jmmcr.0.000099
44. Vasconcelos D de M, Domingues-Ferreira M, Soares MCP, et al. *Cryptococcus gattii*: immunological and microbiological study in a patient with neurocryptococcosis. *JMM Case Reports*. 2015;2(5). doi:10.1099/jmmcr.0.000099
45. Amaral DM do, Rocha R de CC, Carneiro LEP, Vasconcelos DM, Abreu MAMM de. Disseminated cryptococcosis manifested as a single tumor in an immunocompetent patient, similar to the cutaneous primary forms. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2016;91(5 suppl 1):29-31. doi:10.1590/abd1806-4841.20164582
46. Cogliati M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. *Scientifica*. 2013;2013:1-23. doi:10.1155/2013/675213
47. Bicanic T, Harrison TS. Cryptococcal meningitis. *British Medical Bulletin*. 2004;72(1):99-118. doi:10.1093/bmb/ldh043
48. Pappalardo MC, Paschoal RC, Melhem MS. AIDS-associated central nervous system cryptococcosis: a Brazilian case study. *AIDS*. 2007;21(14):1971-1972. doi:10.1097/01.aids.0000287549.79368.33
49. Chen SC-A, Slavin MA, Heath CH, et al. Clinical Manifestations of *Cryptococcus gattii* Infection: Determinants of Neurological Sequelae and Death. *Clinical Infectious Diseases*. 2012;55(6):789-798. doi:10.1093/cid/cis529
50. Chau TT, Mai NH, Phu NH, et al. A prospective descriptive study of cryptococcal meningitis in HIV uninfected patients in Vietnam - high prevalence of *Cryptococcus neoformans* var *grubii* in the absence of underlying disease. *BMC Infectious Diseases*. 2010;10(1). doi:10.1186/1471-2334-10-199
51. Tseng H-K, Liu C-P, Ho M-W, et al. Microbiological, Epidemiological, and Clinical Characteristics and Outcomes of Patients with Cryptococcosis in Taiwan, 1997–2010. Chaturvedi V, ed. *PLoS ONE*. 2013;8(4):e61921. doi:10.1371/journal.pone.0061921
52. Pitisuttithum P, Tansuphasawadikul S, Simpson AJH, Howe PA, White NJ. A Prospective Study of AIDS-associated Cryptococcal Meningitis in Thailand Treated with High-dose Amphotericin B. *Journal of Infection*. 2001;43(4):226-233. doi:10.1053/jinf.2001.0916
53. Brouwer AE, Rajanuwong A, Chierakul W, et al. Combination antifungal therapies for HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomised trial. *The Lancet*. 2004;363(9423):1764-1767. doi:10.1016/S0140-6736(04)16301-0
54. Dromer F, Mathoulin-Pélissier S, Launay O, Lortholary O, the French Cryptococcosis Study Group. Determinants of Disease Presentation and Outcome during Cryptococcosis: The

- CryptoA/D Study. Perfect JR, ed. *PLoS Medicine*. 2007;4(2):e21. doi:10.1371/journal.pmed.0040021
55. Bicanic T, Brouwer AE, Meintjes G, et al. Relationship of cerebrospinal fluid pressure, fungal burden and outcome in patients with cryptococcal meningitis undergoing serial lumbar punctures: *AIDS*. March 2009;1. doi:10.1097/QAD.0b013e32832605fe
 56. Loyse A, Wainwright H, Jarvis JN, et al. Histopathology of the arachnoid granulations and brain in HIV-associated cryptococcal meningitis: correlation with cerebrospinal fluid pressure: *AIDS*. 2010;24(3):405-410. doi:10.1097/QAD.0b013e328333c005
 57. Robertson EJ, Najjuka G, Rolfes MA, et al. 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(1):74-82. doi:10.1093/infdis/jit435
 58. Bouklas T, Fries BC. Aging as an emergent factor that contributes to phenotypic variation in Cryptococcus neoformans. *Fungal Genetics and Biology*. 2015;78:59-64. doi:10.1016/j.fgb.2014.10.004
 59. Lee Y-C, Wang J-T, Sun H-Y, Chen Y-C. Comparisons of clinical features and mortality of cryptococcal meningitis between patients with and without human immunodeficiency virus infection. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2011;44(5):338-345. doi:10.1016/j.jmii.2010.08.011
 60. Brizendine KD, Baddley JW, Pappas PG. Predictors of Mortality and Differences in Clinical Features among Patients with Cryptococcosis According to Immune Status. Feldmesser M, ed. *PLoS ONE*. 2013;8(3):e60431. doi:10.1371/journal.pone.0060431
 61. Rolfes MA, Hullsiek KH, Rhein J, et al. The Effect of Therapeutic Lumbar Punctures on Acute Mortality From Cryptococcal Meningitis. *Clinical Infectious Diseases*. 2014;59(11):1607-1614. doi:10.1093/cid/ciu596
 62. Liechty CA, Solberg P, Were W, et al. Asymptomatic serum cryptococcal antigenemia and early mortality during antiretroviral therapy in rural Uganda. *Tropical Medicine & International Health*. 2007;12(8):929-935. doi:10.1111/j.1365-3156.2007.01874.x
 63. Govender NP, Patel J, van Wyk M, Chiller TM, Lockhart SR, for the Group for Enteric, Respiratory and Meningeal Disease Surveillance in South Africa (GERMS-SA). Trends in Antifungal Drug Susceptibility of Cryptococcus neoformans Isolates Obtained through Population-Based Surveillance in South Africa in 2002-2003 and 2007-2008. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011;55(6):2606-2611. doi:10.1128/AAC.00048-11
 64. Ford N, Shubber Z, Jarvis JN, et al. CD4 Cell Count Threshold for Cryptococcal Antigen Screening of HIV-Infected Individuals: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*. 2018;66(suppl_2):S152-S159. doi:10.1093/cid/cix1143
 65. Córdoba S, Vivot W, Szusz W, Isla G, Davel G. Comparison of Different In Vitro Tests to Detect Cryptococcus neoformans Not Susceptible to Amphotericin B. *Mycopathologia*. 2015;179(5-6):359-371. doi:10.1007/s11046-015-9871-8
 66. Vena A, Muñoz P, Guinea J, et al. Fluconazole resistance is not a predictor of poor outcome in patients with cryptococcosis. *Mycoses*. September 2018. doi:10.1111/myc.12847
 67. Mondon P, Petter R, Amalfitano G, et al. Heteroresistance to Fluconazole and Voriconazole in Cryptococcus neoformans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999;43(8):1856-1861. doi:10.1128/AAC.43.8.1856
 68. Yamazumi T, Pfaller MA, Messer SA, et al. Characterization of Heteroresistance to Fluconazole among Clinical Isolates of Cryptococcus neoformans. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(1):267-272. doi:10.1128/JCM.41.1.267-272.2003
 69. Rodero L, Cordoba S, Cahn P, et al. Timed-kill curves for Cryptococcus neoformans isolated from patients with AIDS. *Medical mycology*. 2000;38(3):201-207.

SUPPLEMENTARY DATA

During the evaluation of the multiple model, it was observed that there were 3 influential observations (with delta-deviance higher than the delta-deviance cutoff point of 4) and 5 outliers (observations with a leverage greater than 3 times the average of the sample) and after exclusion of those observations the associations found maintained their associations (Table S1 and Table S2).

Figure S1- Delta-deviance and leverage of observations generating the multiple model using the variables age, CSF yeast count-log and systemic arterial hypertension and neurological impairment by computed tomography (SAH/NICT) associated with hospital death

Figure S2- Survival curves until the hospital death, according to the variables selected for the multiple analysis model adjusted. A1) Age adjusted by systemic arterial hypertension or neurologic impairment by computerized tomography (SAH/NICT), A2) Age adjusted by CSF yeast count adjusted B1) CSF yeast count adjusted by SAH/NICT, B2) CSF yeast count adjusted by age, C1) SAH/NICT adjusted by yeast count CSF, C2) SAH/NICT adjusted by age

Figure S3 - Delta-deviance and leverage of observations generating the multiple model using the CSF yeast count-log, positive blood culture for *Cryptococcus* spp. and neurotoxoplasmosis, associated with composed outcome (hospital death or intensive care unit referral or relapse of cryptococcosis).

Table S1- Multiple analysis by logistic regression of variables associated with death hospital, without the influential observations (with delta-deviance higher than the cutoff point of 4)

Variable	Odds Ratio	Confidence Interval 95%	p
Age (years)	1,11	1,027-1,19	0,008
CSF yeast count-log	2,15	1,33-3,47	0,002
SAH/NICT	324,80	11,40-9254,30	0,001

SAH/NICT, systemic arterial hypertension and neurological impairment by computed tomography

Table S2 - Multiple analysis by logistic regression of variables associated with death hospital, without the outliers (observations with a leverage greater than 3 times the average of the sample = 0.1360473)

Variable	Odds Ratio	Confidence Interval 95%	p
Age (years)	1,07	1,00-1,14	0,04
CSF yeast count-log	2,14	1,30-3,54	0,003
SAH/NICT	17,32	1,74-172,15	0,01

SAH/NICT, systemic arterial hypertension and neurological impairment by computed tomography

Table S3 – Multiple analysis by logistic regression of variables associated with composed outcome (hospital death or intensive care unit referral or relapse of cryptococcosis), without the influential observations (with delta-deviance higher than cutoff point of 4)

Variable	Odds Ratio	Confidence Interval 95%	p
CSF yeast count-log	1,50	1,20-1,87	<0,001
positive blood culture for <i>Cryptococcus</i> spp.	3,28	0,86-12,56	0,08
neurotoxoplasmosis	1	-	-

CSF, cerebrospinal fluid

Table S4 - Multiple analysis by logistic regression of variables associated with composed outcome (hospital death or intensive care unit referral or relapse of cryptococcosis), without the outliers (observations with a leverage greater than 3 times the average of the sample=0.2644407)

Variable	Odds Ratio	Confidence Interval 95%	p
CSF yeast count-log	1,71	1,27-2,29	<0,001
positive blood culture for <i>Cryptococcus</i> spp.	3,70	0,89-15,30	0,07
neurotoxoplasmosis	15,8	1,49-166,95	0,02

CSF, cerebrospinal fluid

Submission Confirmation for your paper

Transactions <em@editorialmanager.com>

Sex, 10/05/2019 15:19

Para: Lidiane Oliveira <lidiane.deoliveira@usp.br>

CC: "Renata Buccheri" renatabuccheri@gmail.com, "Oscar José Chagas" oscarchagasf@hotmail.com, "Marcia de Souza Carvalho Melhem" melhemmr@uol.com.br, "José Ernesto Vidal" josevibe@gmail.com.br, "Fredri Alexander Diaz-Quijano" frediazq@msn.com

Manuscript Title: Early clinical and microbiological predictors of outcome in hospitalized patients with cryptococcal meningitis

Corresponding Author: Ms. Lidiane Oliveira

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene

Dear Ms. Oliveira,

Thank you for submitting your manuscript entitled "Early clinical and microbiological predictors of outcome in hospitalized patients with cryptococcal meningitis" to Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on as an author. The URL is <https://www.editorialmanager.com/trstmh/>.

Thank you for considering this journal for your work. If your manuscript is sent for peer review, we aim to provide a decision within 6 weeks of submission.

Kind regards,

Editorial Office on behalf of Clodagh McGuire, Managing Editor
TRSTMH

The journal is published by the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene (RSTMH), which has been dedicated to improving tropical medicine and global health since 1907. Through our network of members across the world, we facilitate research, share knowledge, guide lifelong careers, and drive impact. Find out more about what we do and becoming a member by signing up to our newsletter: <https://rstmh.org/newsletter>

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/trstmh/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

CURRICULOS

Lidiane de Oliveira

Bolsista de Doutorado do CNPq

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/3994898323601674>
Última atualização do currículo em 26/02/2019

Doutoranda pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Metodista de São Paulo (2008), aprimoramento profissional em Micologia Médica pelo Instituto Adolfo Lutz (2012) e mestrado em Ciências pela Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria do Estado de Saúde de São Paulo (CCD/SP) e Instituto Adolfo Lutz - SP(2015). Possui experiência na área de Microbiologia, com ênfase em Micologia e atua nos seguintes temas: epidemiologia e diagnóstico de doenças causadas por fungos, biologia molecular e resistência a antifúngicos. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Lidiane de Oliveira
Nome em citações bibliográficas	OLIVEIRA, L.;Oliveira, L.;DE OLIVEIRA, LIDIANE;OLIVEIRA, LIDIANE

Endereço

Endereço Profissional	Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 355 Cerqueira César 01246902 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30682965 Ramal: 2890 Fax: (11) 30682890 URL da Homepage: www.ial.sp.gov.br
------------------------------	---

Formação acadêmica/titulação

2015	Doutorado em andamento em Saúde Pública (Conceito CAPES 6). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Fatores microbiológicos da criptococose e sua importância na carga da doença em pacientes atendidos em um hospital de referência do Estado de São Paulo, Orientador: Fredi Alexander Diaz Quijano. Coorientador: Marcia de Souza Carvalho Melhem. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
2012 - 2015	Mestrado em Ciências (Conceito CAPES 4). Coordenadoria de Controle de Doenças, CCD, Brasil. Título: Estudo de características dos agentes de criptococose: genótipos, polimorfismo, melanização e suscetibilidade a antifúngicos, Ano de Obtenção: 2015. Orientador: Marcia de Souza Carvalho Melhem. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
2010 - 2012	Aperfeiçoamento em Aprimoramento Profissional em Micologia Médica. (Carga Horária: 3800h). Instituto Adolfo Lutz, IAL, Brasil. Título: Atividade fungicida de anfotericina B frente a isolados clínicos de <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>C. gattii</i> pela metodologia de Curva de Morte. Ano de finalização: 2012. Orientador: Maria Walderez Szeszs. Bolsista do(a): Fundação do Desenvolvimento Administrativo, FUNDAP, Brasil.
2005 - 2008	Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Metodista de São Paulo, UMESP, Brasil. Título: ANÁLISE DE FATORES FÍSICOS E BIOQUÍMICOS PARA BIODEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS SÓLIDOS POR <i>Fusarium</i> sp. Orientador: Marta Cristina Souza.

Formação Complementar

Fredi Alexander Diaz Quijano

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/7293505740799476>

Última atualização do currículo em 09/04/2019

Possui graduação em Medicina - Universidad Industrial de Santander (2003), mestrado em Epidemiologia - Universidad Industrial de Santander (2007) e doutorado em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo (2011). Desenvolveu atividades de ensino de pós-graduação na Universidad Industrial de Santander (Colombia). Como pesquisador, realizou estudos sobre fatores de risco, ferramentas de diagnóstico, prognóstico e tratamento de eventos de interesse em saúde pública, especialmente na área de doenças infecciosas. Através da geração de escalas de risco, ganhou prêmios de sociedades científicas na Colômbia e, em 2012, recebeu uma menção honrosa atribuída pela CAPES por sua tese de doutorado. Atualmente é professor da Universidade de São Paulo, Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Fredi Alexander Diaz Quijano
Nome em citações bibliográficas	DÍAZ-QUIJANO, F. A.;Díaz-Quijano, Fredi Alexander;Díaz-Quijano, Fredi;ALEXANDERDÍAZQUIJANO, F;Díaz, Fredi Alexander;Díaz-Quijano, Fredi Alexander;Díaz-Quijano, Fredi A.;Díaz-Quijano FA;DÍAZ-QUIJANO, F.A.;DÍAZ-QUIJANO, FREDI A;Díaz-Quijano FA.;Díaz-Quijano, Fredy;DÍAZ-QUIJANO F;DÍAZ-QUIJANO, F.;DÍAZ-QUIJANO, FREDI ALEXANDER;DÍAZ QUIJANO, FREDI ALEXANDER;DÍAZ, F;QUIJANO, F.A.D.;DÍAZ-QUIJANO, FREDI

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Epidemiologia. Faculdade de Saúde Pública Pacaembu 01246904 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30617710 URL da Homepage: www.fsp.usp.br
------------------------------	--

Formação acadêmica/titulação

2009 - 2011	Doutorado em Saúde Pública (Conceito CAPES 6). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Definições de Caso e Classificação da Gravidade do dengue e suas Implicações no Aprimoramento da Vigilância e de Intervenções em Saúde Pública, Ano de obtenção: 2011. Orientador: Eliseu Alves Waldman. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
2006 - 2007	Mestrado em Maestría en Epidemiologia. Universidad Industrial de Santander, UIS, Colômbia. Título: Predictores de sangrado espontâneo en pacientes con síndrome febril agudo de un área endémica de dengue.,Ano de Obtenção: 2007. Orientador: Luis Angel Villar Centeno.
1998 - 2003	Graduação em Medicina. Universidad Industrial de Santander, UIS, Colômbia.

Livre-docência

2018	Livre-docência. Faculdade de Saúde Pública da USP, FSP/USP, Brasil. Título: Estudo dos determinantes das arboviroses na América Latina, Ano de obtenção: 2018. Palavras-chave: dengue; Arboviroses; Determinantes; Epidemiologia. Grande área: Ciências da Saúde Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Saúde Pública.
-------------	---

Marcia de Souza Carvalho Melhem

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 2

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2132609720093419>
Última atualização do currículo em 25/03/2019

Possui graduação em Farmácia e Bioquímica pela Universidade de São Paulo (1977), especialização (1980), mestrado (1987) e doutorado (1997) em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo. Pesquisador-Científico Nível VI do Instituto Adolfo Lutz, docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências, Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria da Saúde. Dirigente de grupo do Diretório Nacional de Grupos de Pesquisas do CNPq. Membro da Comissão Estadual de Controle das Infecções Hospitalares. Atua nos seguintes temas: diagnóstico de doenças fúngicas, infecção hospitalar por fungos, mecanismos de ação e resistência a fármacos antifúngicos, desenvolvimento de novos fármacos antimicóticos- Drug Discovery & Development. Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Marcia de Souza Carvalho Melhem
Nome em citações bibliográficas	MELHEM, M. S. C.; Melhem, Marcia; Melhem, Márcia; Melhem MSC; Melhem M; SOUZA CARVALHO MELHEM, MARCIA; MELHEM MS; MELHEM, MSC; MELHEM, MÁRCIA S.C.; MELHEM, MÁRCIA DE SOUZA CARVALHO; Marcia S. Melhem; Melhem, Marcia C.; MELHEM, MÁRCIA SOUZA CARVALHO; MELHEM, MARCIA DE SOUZA CARVALHO; MELHEM, MARCIA S.C.; MELHEM, MÁRCIA SOUZA C.; MARCIA SOUZA DE CARVALHO MELHEM; MELHEM, MARCIA SOUZA DE CARVALHO; Marcia S.C. Melhem; MELHEM, M. S.; M Sc Melhem; MELHEM, M.S.C.; MELHEM, MARCIA S. C.; MARCIA MELHEM; MELHEM M; MARCIA SC MELHEM; MELHEM MC; Marcia de Souza Carvalho Melhem; DE SOUZA CARVALHO MELHEM, MARCIA; Latin American Cryptococcal Study Group

Endereço

Endereço Profissional	Instituto Adolfo Lutz, Divisão Técnica de Biologia Médica, Serviço de Parasitologia. Av. Dr. Arnaldo, 355 - 8o. andar-Sessão de Micologia Cerqueira Cezar 01246-902 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30682890 Fax: (11) 30853505 URL da Homepage: http://www.ial.sp.gov.br
------------------------------	--

Formação acadêmica/titulação

1990 - 1997	Doutorado em Saúde Pública (Conceito CAPES 6). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: BIOTIPOS E CARIOTIPOS DE Candida albicans isoladas de pacientes com candidíase bucal associada à AIDS, Ano de obtenção: 1997. Orientador: Sandra Maria Ottati de Oliveira Nitrini. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil. Palavras-chave: candida cariotipagem PFGE morfotipo biotipo bucal. Grande área: Ciências Biológicas Setores de atividade: Saúde Humana.
1982 - 1987	Mestrado em Saúde Pública (Conceito CAPES 6). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: LEVEDUROSES NA SÍNDROME DE IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA, Ano de Obtenção: 1988. Orientador: JOÃO PESSOA DE PAULA CARVALHO. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil. Palavras-chave: CANDIDÍASE CRIPTOCOCOSE AIDS FUNGOS LEVEDURAS HANS. Grande área: Ciências Biológicas Setores de atividade: Saúde Humana.
1979 - 1979	