UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização molecular, susceptibilidade a antifúngicos e
virulência de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp**

Patrícia Helena Grizante Barião

Ribeirão Preto

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização molecular, susceptibilidade a antifúngicos e
virulência de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioagentes e Biotecnologia Aplicados à Farmácia.

Orientado: Patrícia Helena Grizante Barião

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Regina von Zeska Kress

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Biociências e Biotecnologia em 04/06/2019. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

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.

Barião, Patrícia Helena Grizante

Caracterização molecular, susceptibilidade a antifúngicos e virulência de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. Ribeirão Preto, 2019.

164 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Bioagentes e Biotecnologia Aplicados à Farmácia

Orientadora: von Zeska Kress, Marcia Regina

1. *Cryptococcus* spp.
2. Criptococose.
3. Sorologia HIV.
4. Identificação molecular.
5. Virulência.
6. Susceptibilidade aos antifúngicos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Patrícia Helena Grizante Barião

Título do trabalho: Caracterização molecular, susceptibilidade a antifúngicos e virulência de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioagentes e Biotecnologia Aplicados à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Regina von Zeska Kress

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Sandra Aparecida Grizante Barião e Mauro Aparecido Barião, a meu irmão, Mauro Henrique Grizante Barião e a meu avô, José Grizante (*In memoriam*) pelo apoio e ensinamentos que carregarei por toda a minha vida. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder saúde e iluminar meu caminho me dando forças para seguir sempre em frente;

A minha orientadora, Profa. Dra. Marcia Regina von Zeska Kress pela oportunidade de fazer mestrado em seu laboratório. Pela sua dedicação, paciência, ensinamentos e críticas construtivas que ajudaram na minha evolução ao longo desta jornada;

A Profa. Dra. Erika Nascimento, por ter aparecido no meu caminho e me apresentado a minha orientadora, sem você esse sonho não teria se tornado realidade. Obrigada por todos os ensinamentos, paciência, apoio, incentivo e principalmente pela sua amizade que construímos ao longo dessa jornada;

A todos os mestres, que participaram de alguma forma desta minha trajetória, contribuindo para a pessoa que sou hoje;

Aos meus queridos pais, Sandra Aparecida Grizante Barião e Mauro Aparecido Barião pela educação, ensinamentos, apoio, paciência, incentivo e amor incondicional. Obrigada por tudo! Amo vocês;

A meu irmão, Mauro Henrique Grizante Barião pelo apoio, incentivo e amor incondicional. Obrigada “tato”! Amo você;

As minhas avós, Tereza Pompolim Barião (*In memoriam*) e Odete da Silva Grizante. Ao meu avô, Antônio Barião (*In memoriam*), que não tive a oportunidade de conhecer, mas tenho certeza que onde estiver está feliz por mim e principalmente ao meu avô, José Grizante (*In memoriam*) que sempre torceu e me incentivou nessa minha jornada. Obrigada por tudo! Amo vocês;

Aos amigos que conheci durante essa jornada, Tiago Alexandre Cocio, Adriana Oliveira, Guilherme Serafim e Lucas Chaves. Agradeço a todos, pelo apoio e principalmente pela amizade que construímos ao longo dessa jornada. Em especial, agradeço ao Tiago Alexandre Cocio por todos os conselhos, ensinamentos, paciência e companheirismo. Obrigada a todos por tudo!

A equipe científica do Laboratório de Micologia Clínica de Expressão Gênica e Proteômica de Fungos Filamentosos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da

Universidade de São Paulo (FCFRP–USP), Michelle Alves de Mello, Mario Henrique Paziani, Glaucia Rigotto. Em especial a Ludmilla Tonani pelos ensinamentos, paciência e apoio;

A equipe científica do Laboratório de Microbiologia Clínica da área de Moléstias Infecciosas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMR–USP);

Ao Prof. Dr. Roberto Martinez, coordenador do Laboratório de Microbiologia do HCFMRP–USP por ter cedido todos os isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.;

Ao Prof. Dr. Reginaldo dos Santos Pedroso, por ter cedido às linhagens controle dos tipos moleculares de *Cryptococcus* spp;

Ao Prof. Dr. Gilberto Úbira Leite Braga do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP e sua equipe científica pela utilização de equipamentos em seu laboratório;

Ao Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia da FCFRP-USP;

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - 2017/25300-8;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001;

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para esta dissertação tornar-se realidade.

“Leve na sua memória para o resto da sua vida as coisas boas que surgiram no meio das dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade em vencer as provas e lhe darão confiança na presença divina, que nos auxilia em qualquer situação, em qualquer tempo, diante de qualquer obstáculo.”

(Chico Xavier)

RESUMO

BARIÃO, Patrícia Helena Grizante. **Caracterização molecular, susceptibilidade a antifúngicos e virulência de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.** 2019. 164 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A criptococose é uma infecção fúngica causada principalmente pelas leveduras encapsuladas *C. neoformans* e *C. gattii*. Entretanto, *C. laurentii* vem emergindo como agente causador desta infecção que acomete tanto indivíduos imunocomprometidos quanto indivíduos imunocompetentes. Com o aumento de indivíduos portadores do HIV/AIDS, o número de casos de criptococose vem aumentando. Portanto, o isolamento e a identificação correta das espécies são essenciais para o entendimento dos diferentes casos de criptococose. O objetivo do presente estudo foi estudar as características moleculares e fenotípicas dos isolados clínicos de pacientes com criptococose oriundos do HCFMRP-USP. Foram estudados 80 casos de criptococose onde foram identificados 132 isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. os quais representam uma amostragem retrospectiva por conveniência do período 2012 a 2017. Destes isolados clínicos, 113 foram identificados como *C. neoformans*, sendo a maioria VNI e 6 VNII, 16 *C. gattii* VGII e 3 *C. laurentii*. Entre os casos clínicos, 52 são pacientes sorotipo HIV positivo, 23 pacientes sorotipo HIV negativo e 5 pacientes em que o sorotipo HIV não foi determinado. Foram observados 3 pacientes sorotipo HIV negativo com ausência de doença subjacente que justificasse o desenvolvimento da criptococose. Nestes, as espécies isoladas foram *C. neoformans* VNI e *C. gattii* VGII. Quanto aos fatores de virulência cápsula polissacarídica e melanina, a porcentagem linear da cápsula polissacarídica dos isolados clínicos *C. neoformans* e *C. gattii* foram semelhantes *C. laurentii* não apresentou cápsula polissacarídica. Entretanto, ao comparar os isolados clínicos considerando o sorotipo HIV do paciente, a porcentagem linear da cápsula polissacarídica dos isolados clínicos de pacientes sorotipo HIV positivo foi maior. Todos os isolados clínicos foram produtores de melanina, porém com diferentes intensidades. A virulência dos isolados clínicos *C. neoformans* em larvas de *G. mellonella* foi considerada maior em comparação a *C. gattii* e *C. laurentii*. Todos os isolados clínicos foram sensíveis a anfotericina B e ao voriconazol. Para o itraconazol (ITR) foram observados isolados clínicos com Sensibilidade Dose Dependente (SDD), sendo 8 *C. neoformans*, 7 *C. gattii* e 1 *C. laurentii*. Para fluconazol (FLU) também foram observados isolados clínicos com SDD, sendo 1 *C. neoformans* e 2 *C. gattii*. Esse perfil foi observado para os tipos moleculares VNI e VGII. Já para 5-flucitosina (5-FC) apenas os isolados clínicos *C. laurentii* apresentaram resistência. A susceptibilidade entre os isolados clínicos considerando o sorotipo HIV dos pacientes mostrou que ambos sorotipos apresentaram isolados clínicos com SDD para ITR; paciente sorotipo HIV positivo apresentou isolado clínico com SDD para FLU e paciente HIV negativo apresentou 1 isolado clínico com resistência a 5-FC. Portanto, constatamos neste trabalho que não houveram diferenças distintas ao correlacionar os fatores de virulência e a virulência em *G. mellonella* entre os isolados clínicos estudados. Além disso, a maioria dos isolados clínicos foi sensível aos antifúngicos utilizados na clínica.

Palavras-chave: *Cryptococcus* spp. Criptococose. Sorologia HIV. Identificação molecular. Virulência. Susceptibilidade aos antifúngicos.

ABSTRACT

BARIÃO, Patrícia Helena Grizante. **Molecular characterization, antifungal susceptibility and virulence of clinical isolates of *Cryptococcus* spp.** 2019. 164 f. Dissertation (Master) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Cryptococcosis is a fungal infection caused by encapsulated yeasts *C. neoformans* and *C. gattii*. However, there are other species causing this infection in humans, such as *C. laurentii*. This infection can affect both immunocompromised individuals and immunocompetent individuals. With the increase in individuals with HIV/AIDS, the number of cases of cryptococcosis has been increasing. In this way, the isolation and correct identification of the species are essential to obtain the different cases of cryptococcosis. The aim of the present study was to study the molecular and phenotypic characteristics of clinical isolates of cryptococcosis patients from HCFMRP-USP. A total of 80 cryptococcosis cases were studied in which 132 *Cryptococcus* sp. strains were isolated. The clinical isolates were a retrospective convenience sampling from the period 2012-2017. Among the clinical isolates, 113 were identified as *C. neoformans*, being the majority VNI and 6 VNII, 16 *C. gattii* VGII and 3 *C. laurentii*. Considering the cryptococcosis cases and HIV serotype, 52 patients were HIV-positive, 23 HIV-negative and 5 patients with undetermined HIV serotype. Three HIV-negative serotype patients without underlying disease that would justify cryptococcosis were observed. The isolated species were *C. neoformans* VNI and *C. gattii* VGII. Regarding the virulence factors, *C. neoformans* and *C. gattii* clinical isolates have shown similar linear percentages of the polysaccharide capsule, whereas *C. laurentii* did not present a polysaccharide capsule. However, when comparing the clinical isolates considering the HIV serotype of the patient, it was observed that the linear percentage of the capsule of the clinical isolates of patients with HIV-positive serotype were higher. All clinical isolates were melanin producers, but with different intensities. The virulence of *C. neoformans* clinical isolates in *G. mellonella* larvae was considered higher in comparison to *C. gattii* and *C. laurentii*. All clinical isolates were sensitive to amphotericin B and voriconazole. For itraconazole (ITR), clinical isolates with Dependent Dose Sensitivity (DDS) were observed. Among them were 8 *C. neoformans*, 7 *C. gattii* and 1 *C. laurentii*. For fluconazole (FLU), clinical isolates with DDS were also observed (1 *C. neoformans* and 2 *C. gattii*). The observed molecular types were VNI and VGII. For flucytosine (5-FC) only the clinical isolates *C. laurentii* presented resistance. The antifungal susceptibility among the clinical isolates considering the HIV serotype of the patients showed that the ITR presented clinical isolates with DDS for patients with both HIV serologies (positive and negative). FLU presented DDS clinical isolates only from HIV positive serotype patients. 5-FC presented 1 clinical isolate from an HIV negative serotype patient with resistance. Therefore, we verified in this study that there were no differences in the correlation between virulence factors and virulence in *G. mellonella* among the clinical isolates studied. In addition, the majority of clinical isolates were sensitive to antifungal agents used in the clinical practice for cryptococcosis treatment.

Keywords: *Cryptococcus* spp. Cryptococcosis. HIV serology. Molecular identification. Virulence. Susceptibility to antifungals.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Ciclo da infecção de <i>Cryptococcus</i> spp.....	28
Figura 2	Espécies de <i>Cryptococcus</i> isoladas dos casos de criptococose dos pacientes sorotipo HIV negativo.....	67
Figura 3	Tipos moleculares de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> isolados dos pacientes sorotipo HIV negativo com criptococose.....	67
Figura 4	Faixa etária dos pacientes sorotipo HIV negativo com criptococose.....	68
Figura 5	Gênero dos pacientes sorotipo HIV negativo com criptococose.....	68
Figura 6	Fluxograma das metodologias utilizadas na identificação molecular dos 132 isolados clínicos e o número de isolados clínicos investigados em cada metodologia.....	70
Figura 7	Determinação das espécies <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> por PCR.....	71
Figura 8	Determinação dos tipos moleculares de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> por PCR-RFLP.....	72
Figura 9	Análise filogenética referente às relações evolutivas entre as espécies de <i>Cryptococcus</i>	79
Figura 10	Análise filogenética referente às relações evolutivas entre as espécies <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	80
Figura 11	Espectros gerados na identificação dos isolados clínicos de <i>C. neoformans</i> por MALDI-TOF MS.....	82
Figura 12	Espectros gerados na identificação dos isolados clínicos de <i>C. laurentii</i> por MALDI-TOF MS.....	83
Figura 13	Espectros gerados na identificação dos isolados clínicos de <i>C. gattii</i> por MALDI-TOF MS.....	83
Figura 14	Identificação molecular final das espécies de <i>Cryptococcus</i> e seus respectivos tipos moleculares.....	84
Figura 15	Cápsula polissacarídica de leveduras de <i>C. neoformans</i> , <i>C. gattii</i> e <i>C. laurentii</i>	87
Figura 16	Análise estatística da produção de cápsula polissacarídica entre os isolados clínicos <i>C. neoformans</i> (n=113) e <i>C. gattii</i> (n=16).....	88
Figura 17	Análise estatística da produção de cápsula polissacarídica entre os isolados clínicos de pacientes sorotipo HIV positivo (n=52) e pacientes sorotipo HIV negativo (n=23).....	88
Figura 18	Padrão de produção de melanina por leveduras em meio de cultura L-Dopa.....	90
Figura 19	Sobrevivência de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas com isolados clínicos e linhagens controle de <i>Cryptococcus</i> spp. em diferentes concentrações de inóculo de levedura.....	93

Figura 20	Curva de sobrevivência em <i>G. mellonella</i> infectadas com isolados clínicos de <i>C. neoformans</i> , <i>C. gattii</i> e <i>C. laurentii</i>	95
Figura 21	Análise estatística comparando a curva de sobrevivência em <i>G. mellonella</i> infectadas com isolados clínicos de <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i> do mesmo paciente.....	97
Figura 22	Análise estatística comparando as Concentrações Inibitórias Mínimas dos antifúngicos para os isolados clínicos de <i>C. neoformans</i> (n=113) e <i>C. gattii</i> (n=16).....	105
Figura 23	Análise estatística comparando as Concentrações Inibitórias Mínimas dos antifúngicos para os isolados clínicos dos pacientes sorotipo HIV positivo (n=52) e sorotipo HIV negativo (n=23).....	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Nomenclatura clássica dos complexos <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	48
Tabela 2	Crítérios de interpretação dos resultados dos testes de sensibilidade <i>in vitro</i> para espécies de <i>Candida</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$).....	59
Tabela 3	Materiais biológicos e os respectivos números de isolados clínicos de <i>Cryptococcus</i> spp.....	62
Tabela 4	Pacientes sorotipo HIV negativo e quantidade de doenças subjacentes.....	64
Tabela 5	Pacientes sorotipo HIV negativo e o número de fatores predisponentes à criptococose.....	65
Tabela 6	Pacientes sorotipo HIV negativo e o número de quadros clínicos.....	66
Tabela 7	Pacientes sorotipo HIV negativos e a evolução da criptococose.....	66
Tabela 8	Identificação molecular dos isolados clínicos de <i>Cryptococcus</i> spp. pela amplificação da região ITS do DNAr.....	74
Tabela 9	Identificação dos isolados clínicos de <i>Cryptococcus</i> spp. por MALDI-TOF MS.....	81
Tabela 10	As espécies de <i>Cryptococcus</i> e produção de melanina.....	90
Tabela 11	Relação do número de isolados clínicos com a intensidade de produção de melanina dos isolados clínicos oriundos de pacientes sorotipos HIV positivo, HIV negativo e HIV não determinado entre as espécies isoladas de <i>Cryptococcus</i>	91
Tabela 12	Isolados clínicos que apresentaram Sensibilidade Dose Dependente e Resistência aos antifúngicos ITR, FLU e 5-FC e ATCCs utilizadas como controle do experimento.....	99
Tabela 13	Determinação da susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antifúngicos de todos os isolados clínicos entre as espécies <i>C. neoformans</i> , <i>C. gattii</i> e <i>C. laurentii</i>	103
Tabela 14	Determinação da susceptibilidade <i>in vitro</i> entre os isolados clínicos, oriundos de pacientes sorotipos HIV positivo e HIV negativo aos antifúngicos.....	107
Tabela 15	Determinação da susceptibilidade <i>in vitro</i> entre os isolados clínicos dos pacientes sorotipos HIV positivo e HIV negativo, referente as espécies obtidas em cada sorotipo aos antifúngicos.....	109

LISTA DE SIGLAS

AMB	Amfotericina B
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BG	Biopsia de Gânglio
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BLASTn	<i>Basic Local Alignment Search Tool nucleotide</i>
BP	Biopsia de Pele
CBS	<i>Centraal Bureau voor Schimmelcultures</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
Dcc	Diâmetro do Corpo Celular
Dci	Diâmetro da Célula Inteira
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DNAg	DNA genômico
DNAr	DNA ribossomal
dNTP	Desoxirribonucleotídios
DO	Densidade Óptica
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
EE	Escarro Espontâneo
EI	Escarro Induzido
EUA	Estados Unidos da América
FCFRP-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
FLU	FLU
HC	Hospital das Clínicas

HCFMR–USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HIV/AIDS	<i>Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
ITR	ITR
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
LBA	Lavado Bronco alveolar
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LMC	Laboratório de Micologia Clínica
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry</i>
MB	Materiais Biológicos
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
MG	Média geométrica
MO	Medula Óssea
MOPS	Morfolinopropanosulfônico
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ND	Não Determinado
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PC	Ponta de Catéter
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
R	Resistência
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RJ	Rio de Janeiro
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotação Por Minuto
RPMI 1640	Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i> 1640
S	Sensibilidade
SDD	Sensibilidade Dose Dependente

DSS	Dodecil sulfato de sódio
SG	Sangue
SI	Sensibilidade Intermediária
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
Tris-HCl	Tris <i>hydrochloride</i>
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean</i>
US	Urina (Sonda)
USP	Universidade de São Paulo
V	Versão
Var	Variedade
VOR	VOR
YPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>
5-FC	5-FC

LISTA DE SÍMBOLOS

-	Menos
%	Porcentagem
<	Menor
±	Mais ou menos
≤	Menor ou igual
°C	Graus Celsius
μg mL ⁻¹	Micrograma e mililitro
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
≥	Maior ou igual
Cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
HCO ₃	Bicarbonato
Kb	Kilobase
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
L	Litro
Mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
N	Quantidade de isolados
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dibásico de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
ng mL ⁻¹	Nanograma e mililitros
Nm	Nanômetro
p/v	Relação peso e volume
Pb	Pares de base
pH	Potencial de hidrogênio iônico
U	Unidade
V	Volt
m/v	Relação massa e volume
v/v	Relação volume e volume
X	Vezes
μg	Micrograma

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	19
1.1 - O GÊNERO CRYPTOCOCCUS.....	19
1.2 - CRYPTOCOCCUS SPP., TIPOS MOLECULARES, TÉCNICAS UTILIZADAS NA IDENTIFICAÇÃO E SUA DISTRIBUIÇÃO NO MUNDO.....	20
1.3 – A CRIPTOCOCOSE.....	27
1.4 - SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS E TRATAMENTO DA CRIPTOCOCOSE..	33
2 – JUSTIFICATIVA.....	38
3 - OBJETIVO GERAL.....	41
3.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 - LOCAL DE ESTUDO.....	43
4.2 - COMITÊ DE ÉTICA.....	43
4.3 - ISOLADOS CLÍNICOS DE PACIENTES COM CRIPTOCOCOSE.....	43
4.4 - DADOS REFERENTES AOS PACIENTES COM CRIPTOCOCOSE.....	44
4.5 - IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	45
4.5.1 - Extração do DNAg, tratamento com RNase, quantificação e eletroforese em gel de agarose.....	45
4.5.2 - Determinação das espécies de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> por PCR.....	47
4.5.3 - Determinação dos tipos moleculares de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> por PCR–RFLP.....	47
4.5.4 – Determinação das espécies de <i>Cryptococcus</i> pela amplificação e sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal.....	49
4.5.5 - Análise filogenética das sequências ITS das espécies de <i>Cryptococcus</i>	50
4.5.6 - Análise das espécies de <i>Cryptococcus</i> por MALDI-TOF MS.....	51
4.6 – VIRULÊNCIA.....	51
4.6.1 - Análise da porcentagem linear da cápsula polissacarídica de <i>Cryptococcus</i> spp.....	52
4.6.2 - Análise da produção de melanina por <i>Cryptococcus</i> spp.....	53
4.6.3 - Análise da virulência de <i>Cryptococcus</i> spp. em modelo animal alternativo <i>Galleria mellonella</i>	54
4.7 - DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS.....	56
4.7.1 - Preparo dos antifúngicos.....	56
4.7.2 - Preparo do inóculo.....	57
4.7.3 - Preparo da placa de microdiluição em caldo.....	57
4.7.4 - Critério de interpretação dos resultados.....	58
4.8 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	59
5 – RESULTADOS.....	62
5.1 - ISOLADOS CLÍNICOS DE PACIENTES COM CRIPTOCOCOSE.....	62
5.2 - DADOS REFERENTE AOS PACIENTES COM CRIPTOCOCOSE.....	63
5.3 – IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	69
5.3.1 - Determinação das espécies de <i>Cryptococcus</i> por PCR.....	70

5.3.2. - Determinação dos tipos moleculares de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> por PCR-RFLP.....	71
5.3.3 - Determinação das espécies de <i>Cryptococcus</i> pela amplificação e sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal.....	73
5.3.4 - Análise filogenética entre as sequências da região ITS do DNAr das espécies de <i>Cryptococcus</i>	77
5.3.5 - Análise das espécies de <i>Cryptococcus</i> por MALDI-TOF MS.....	81
5.3.6 - Identificação molecular final dos isolados clínicos de <i>Cryptococcus</i> spp.....	83
5.4 – VIRULÊNCIA.....	85
5.4.1 - Análise da porcentagem linear da cápsula polissacarídica de <i>Cryptococcus</i> spp.....	85
5.4.2 - Análise da produção de melanina por <i>Cryptococcus</i> spp.....	89
5.4.3 - Análise da virulência de <i>Cryptococcus</i> spp. em modelo animal alternativo <i>Galleria mellonella</i>	92
5.5 - SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS.....	98
5.5.1 - Análise geral da susceptibilidade aos antifúngicos.....	98
5.5.2 - Análise da susceptibilidade aos antifúngicos entre as espécies de <i>Cryptococcus</i>	101
5.5.3 - Análise da susceptibilidade aos antifúngicos entre os isolados clínicos oriundos dos pacientes sorotipos HIV positivo e HIV negativo com criptococose.....	105
6 - DISCUSSÃO.....	113
7 - CONCLUSÃO.....	130
REFERÊNCIAS ¹	132
ANEXOS.....	149
APÊNDICE.....	157

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - O GÊNERO *CRYPTOCOCCUS*

O gênero *Cryptococcus* pertence ao reino *Fungi*, filo *Basidiomycota*, classe *Tremellomycetes*, ordem *Tremellales* e família *Tremellaceae* (LÁZERA; IGREJA; WANKE, 2004). A palavra *Cryptococcus* é uma terminologia descrita por Kutzing em 1833 e tem origem da palavra grega “Kryptos” que significa “escondido/secreto/misterioso” (HEITMAN et al., 2011). Os membros deste gênero são classificados como leveduras não fermentadoras, assimiladoras de inositol, produtoras de melanina e de enzimas como ureases, fosfolipases e peptidases (GOLDMAN; LEE; CASADEVALL, 1994; LÁZERA; IGREJA; WANKE, 2004; KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). Existem em torno de 70 espécies descritas na literatura, sendo que a maioria é considerada de vida livre, porém existem aquelas que são consideradas saprófitas. Essas leveduras apresentam ampla distribuição geográfica. Devido a isso, são consideradas cosmopolitas, estando presentes em diversas fontes como, árvores, solos, ar, animais e principalmente em excretas de aves (JOHNSON; BRADLEY; KAUFFMAN, 1998; CASALI et al., 2001; BICANIC; HARRISON, 2005; LEVITZ; BOEKHOUT, 2006; LIN; HEITMAN, 2006; KHAWCHAROENPORN; APISARNTHANARAK; MUNDY, 2007; KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011; TAKAHARA, 2011; CARDOSO, 2012; COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014). A explicação da abundância de leveduras encontradas nas excretas de aves, principalmente pombos, se deve ao fato de que *Cryptococcus* spp. utiliza creatina, ácido úrico, xantinas e purinas presentes nas excretas como fonte de nitrogênio para a sua reprodução e sobrevivência (LEVITZ et al., 1991; QUEIROZ et al., 2008).

A reprodução dessa levedura ocorre nas formas sexuada e assexuada. A reprodução assexuada também conhecida como fase anamórfica ocorre por meio de brotamentos singulares ou múltiplos das leveduras que se apresentam na forma arredondada e/ou oval, sem a formação de pseudo-hifas ou hifas (HULL; DAVIDSON; HEITMAN, 2002; LACAZ et al., 2002). Já a reprodução sexuada, é conhecida como fase teleomórfica, onde as espécies de *Cryptococcus* se desenvolvem na forma filamentosa dicárica (presença de dois núcleos de origens

diferentes) que se desenvolvem em basídios os quais dão origem aos basidiósporos (HULL; DAVIDSON; HEITMAN, 2002). Este é um fungo heterotático onde a reprodução sexual necessita de compatibilidade bipolar entre os alelos no *locus* sexual do fungo (MITCHELL, 2003; OKABAYASHI et al., 2006). A reprodução sexual contribui para a seleção natural e com isto proporciona à adaptação dos microrganismos as condições ambientais, possibilitando que mutações “benéficas” se espalhem. O papel da reprodução sexual na patogenicidade fúngica vem sendo bastante estudado. Porém, já foi observado que os fungos patogênicos limitam os seus ciclos sexuais, gerando assim, populações clonais ao invés de populações recombinantes, permitindo a sua adaptação a novas condições ambientais e inclusive no hospedeiro. Devido a capacidade desses fungos em se reproduzir dessas duas formas distintas, são importantes alvos de estudos para melhor compreensão de sua patogenia nos indivíduos (KWON-CHUNG, 1975; BARNETT, 2010).

As colônias do gênero *Cryptococcus* crescidas em meios de cultura clássicos, como o Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), crescem como leveduras. *C. neoformans* e *C. gattii* apresentam colônias de coloração creme, aspecto brilhante, opaco e/ou mucoide e a textura rugosa e/ou lisa (LÁZERA; IGREJA; WANKE, 2004). Já as colônias de *C. laurentii*, apresentam-se com aspecto brilhante, textura lisa e conforme o tempo da incubação pode variar quanto a sua coloração, podendo apresentar colônias de cor creme, amarela, rosa e/ou laranja (PEDROSO et al., 2010b). As células leveduriformes apresentam-se microscopicamente de forma esférica, globular e/ou ovoide, com diâmetro variável entre 2 a 10 µm, essas são envolvidas por uma cápsula polissacarídica, constituída por 90% de glucuronoxilomananos (GXM), e contendo ainda ácido glucurônico, xilose e manose (MITCHELL; PERFECT, 1995; HULL; DAVIDSON; HEITMAN, 2002; KWON-CHUNG; VARMA, 2006; DEL PETA; CASADEVALL, 2012).

1.2 - *CRYPTOCOCCUS* SPP., TIPOS MOLECULARES, TÉCNICAS UTILIZADAS NA IDENTIFICAÇÃO E SUA DISTRIBUIÇÃO NO MUNDO

O gênero *Cryptococcus* possui duas espécies principais que causam infecções em humanos, *C. neoformans* e *C. gattii*. Contudo, atualmente têm sido

observados vários relatos na literatura de outras espécies causando esta infecção em humanos como, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus adeliensis*, *Cryptococcus humiculus*, *Cryptococcus luteolus* e *Cryptococcus macerans*. *C. laurentii* e *C. albidus* representam 80% dos casos relatados como não-*neoformans* e não-*gattii* (JOHNSON; BRADLEY; KAUFFMAN, 1998; KHAWCHAROENPORN; APISARNTHANARAK; MUNDY, 2007; ANAÏSSIE; MCGGINNIS; PFALLER, 2009; TAKAHARA, 2011; CARDOSO, 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012; KIDD et al., 2016). *Cryptococcus* spp. também pode causar infecções em animais (CASTELLÁ; ABARCA; CABAÑES, 2008; HEITMAN et al., 2011).

O primeiro isolamento de *Cryptococcus* spp. foi realizado por Francisco Sanfelice na Itália em 1894, onde isolou esta levedura do suco de pêssgo e a classificou como *Saccharomyces neoformans*, através da inoculação em animais de laboratório foi observado a patogenicidade desta levedura (CASADEVALL; PERFECT, 1998). Neste mesmo ano na Alemanha, esse patógeno foi observado por Otto Busse e Abraham Buschke em um caso reportado com infecção disseminada em humano, onde foram observados corpúsculos ovais isolados de uma lesão da tíbia de uma paciente do gênero feminino. Em 1901, Jean Paul Vuilleman reviu esses isolados e renomeou este patógeno como *Cryptococcus*, pelo fato do gênero *Saccharomyces* ser fermentador de açúcar e o microrganismo em questão não ser fermentador (LÁZERA et al., 2004). Em 1902 essa mesma espécie foi isolada de uma lesão pulmonar de um cavalo; comprovando, com isto, que esse fungo também causa infecções em animais. Desde então, foram surgindo vários relatos de *Cryptococcus* causando infecções em humanos e animais, além disso, também foi constatada a predileção desse fungo pelo Sistema Nervoso Central (SNC) do indivíduo (LACAZ et al., 2002; HEITMAN et al., 2011).

A classificação do complexo *C. neoformans* e *C. gattii* é baseada em estudos referentes à homologia da sequência do DNA e nas análises das sequências do DNA ribossômico (DNAr) (HULL; DAVIDSON; HEITMAN, 2002). Além dessas diferenças genéticas, foram observadas diferenças fisiológicas, patogênicas e ecológicas entre as espécies e seus respectivos tipos moleculares (HAGEN et al., 2015). *C. neoformans* é subdividido em *C. neoformans* var. *grubii* contendo os tipos moleculares VNI, VNII e VNB (sorotipo A), *C. neoformans* var. *neoformans* com o tipo molecular VNIV (sorotipo D) e *C. neoformans* var. *grubii* x *C. neoformans* var.

neoformans (sorotipo AD). Já *C. gattii* apresenta os tipos moleculares VGI, VGII, VGIII (sorotipo B) e VGIV (sorotipo C) (MEYER et al., 2003; LIN; HEITMAN, 2006; SILVA et al., 2012). Atualmente existe a sugestão de alteração desta nomenclatura, onde os tipos moleculares são distribuídos em oito novas espécies. As espécies propostas foram: *C. neoformans* para os tipos moleculares VNI e VNII, *C. deneoformans* para o tipo molecular VNIV, *C. neoformans* x *C. deneoformans* para o tipo molecular VNIII, *C. gattii* para o tipo molecular VGI, *C. deuterogattii* para o tipo molecular VGII, *C. bacillisporus* para o tipo molecular VGIII, *C. tetragattii* para o tipo molecular VGIV e *C. decagattii* para os tipos moleculares VGIV e VGIII (HAGEN et al., 2015). Porém esta classificação ainda não está completamente aceita na literatura. Sendo assim, o presente trabalho foi descrito de acordo com a nomenclatura clássica descrita por Meyer et al. (2003).

As espécies raras e/ou menos isoladas como as leveduras de *C. laurentii*, necessitam de uma identificação mais especializada. Em estudos baseados na análise da composição das bases de DNA nuclear e nos padrões de proteínas celulares, desse patógeno, foi revelado que *C. laurentii* também apresenta um grupo heterogêneo, sendo classificado como complexo *C. laurentii*. Devido a esta heterogeneidade na espécie e ao aumento da incidência em infecções, este microrganismo vem sendo bastante estudado (PEDROSO et al., 2010b; FARIA et al., 2014). Atualmente, os estudos filogenéticos das espécies *C. laurentii* e *C. albidus* que foram relatadas como caso clínico não-*neoformans* e não-*gattii* estão levando estas espécies a uma nova reclassificação (LIU et al., 2015a; LIU et al., 2015b).

O diagnóstico laboratorial clássico das espécies do gênero *Cryptococcus* é realizado por meio de exames direto, histológico, sorológico e cultura. O exame direto é realizado pela coloração da levedura com tinta nanquim para evidenciar a cápsula polissacarídica do fungo. O exame histopatológico é através da observação das características micromorfológicas das leveduras em amostras obtidas de biopsia. O isolamento do fungo é realizado em cultura e pode ser feito através de diferentes materiais biológicos, como líquido cefalorraquidiano (LCR), sangue (SG), escarro induzido (EI) ou escarro espontâneo (EE), urina, entre outras (PEDROSO; CANDIDO, 2006; GAZZONI et al., 2009). A cultura é destacada como método “padrão ouro” para o isolamento e identificação do fungo (PAPPALARDO; MELHEM, 2003; PASQUALOTTO et al., 2004). Devido às limitações no diagnóstico laboratorial clássico as quais dificultam a identificação final da espécie, novas abordagens estão

sendo adotadas, como os métodos moleculares que vêm mostrando ser uma ferramenta excelente na identificação dessas espécies, além de confiável. Os métodos moleculares apresentam alta sensibilidade e especificidade, disponibilizando um diagnóstico precoce e rápido das suspeitas de criptococose (SAHA et al., 2009). Além de contribuírem na identificação da espécie, os métodos moleculares também possibilitam a identificação da variedade, tipo molecular e consequentemente o sorotipo do gênero *Cryptococcus*, sendo este essencial para estudos epidemiológicos. Desta maneira, as metodologias moleculares são essenciais para a identificação e a compreensão da virulência, patogênese e perfil de suscetibilidade de *Cryptococcus* spp. aos antifúngicos (SIDRIM et al., 2010; PASA, 2011).

Entre as principais técnicas moleculares que são utilizadas na diferenciação das espécies de *Cryptococcus*, a *Polymerase Chain Reaction* (PCR) é a mais empregada. A partir do estudo realizado por Aoki et al. (1999) foram desenhados *primers* que diferenciam *C. neoformans* e *C. gattii*. Estudos realizados por Casali et al. (2003) consolidaram estes *primers* para a identificação dessas duas espécies. Os *primers* mais utilizados e que mostraram ser altamente eficazes nessa metodologia foram CNa-70-A e CNa-70-S para a identificação de *C. neoformans* e CNb-49-A e CNb-49-S para *C. gattii*, com tamanho de fragmento de banda do DNA de 695 pb e 448 pb, respectivamente (AOKI et al., 1999).

Para a determinação dos tipos moleculares de *C. neoformans* e *C. gattii* é utilizada a *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) que mostra ser uma ferramenta importante em estudo de epidemiologia molecular, onde são observadas variações entre espécies e intra-espécies (MEYER et al., 2003; TRILLES et al., 2008; MORA et al., 2010). Na PCR-RFLP, um determinado fragmento de DNA é amplificado com *primers* específicos e submetido às enzimas/endonucleases de restrição, gerando fragmentos com sequências e tamanhos específicos (ABREU, 2008). Para *Cryptococcus* spp, os genes de polimorfismo amplificados para realizar a RFLP podem ser *MAT*, *URA5* e/ou *CAP59* (CHATURVEDI et al., 2000; ENACHE-ANGOULVANT et al., 2007; MATOS et al., 2012) que detectam as sequências do DNA minissatélites e microssatélites em cada espécie (MEYER et al., 2003; MORA et al., 2010). O gene *URA5* é o mais utilizado na PCR-RFLP o qual possui tamanho de fragmento correspondente a 850 pb (XU; VILGALYS; MITCHELL, 2000; SORRELL, 2001), apresentando uma cópia única

com sequência conhecida, sendo polimórfica e com uma conservação primária na estrutura da enzima (CASADEVALL et al., 1992b). Este gene codifica a enzima orotidina monofosfato pirofosforilase que apresenta 98% de similaridade entre os tipos moleculares VNI, VNII, VNIII, VNIV, VGI, VGII, VGIII e VGIV. Este valor de similaridade é determinante na diferenciação dos tipos moleculares do complexo *C. neoformans* e *C. gattii* (CASADEVALL; FAN, 1992a).

A identificação molecular baseada na amplificação da região *Internal Transcribed Spacer* (ITS) do DNA ribossomal (DNAr), considerada região com sequência de DNA conservada, possibilita uma classificação criteriosa sobre a identificação de gênero e espécies de fungos em geral, sendo considerado um “código de barras” universal para identificação do reino *Fungi* (WHITE et al., 1990; SCHOCH et al., 2012). Esta técnica também vem sendo muito utilizada para a identificação das espécies do gênero *Cryptococcus* (WENGENACK; BINNICKER, 2009; FERREIRA-PAIM, et al., 2011; SCHOCH, et al., 2012; KÖLJALG et al., 2013). Entretanto, a diferenciação entre as espécies *C. gattii* e *C. neoformans* não é eficientemente realizada pelo sequenciamento da região ITS (VU et al., 2016). A análise da composição do DNA com amplificação da região D1/D2 do ITS, possibilitou a divisão do complexo *C. laurentii* em dois grupos filogenéticos, onde são separados por características bioquímicas e fisiológicas, através de assimilação de carboidrato, fontes de nitrogênio e até mesmo por requerimentos vitamínicos. Com isto, diferentes espécies foram reclassificadas, onde algumas espécies foram transferidas para outros gêneros e outras foram incluídas neste complexo (SUGITA et al., 2000; TAKASHIMA et al., 2003).

A espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz - tempo de voo (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry* – MALDI-TOF MS) é um método de ionização da amostra onde subsequentemente esta é submetida a uma espectrometria de massa. Esse recurso está sendo utilizado como um complemento para as metodologias fenotípicas e genotípicas, sendo usadas em laboratórios clínicos e aplicados, auxiliando a identificação de microrganismos como bactérias e fungos (SANTOS et al., 2010; STEVENSON et al., 2010; CASSAGNE et al., 2011; NEVILLE et al., 2011). Esse método determina dentro de poucos minutos padrões específicos de peptídeos e espectros de massa de proteínas de células microbianas intactas e/ou extratos

celulares de culturas puras e/ou de amostras biológicas, permitindo a discriminação entre as espécies através da comparação do espectro obtido com aquelas incluídas em uma biblioteca espectral de referência. Desta maneira, pacotes de *software* específicos são utilizados para obter os dados, analisa-los e identificar as amostras (BIZZINI; GREUB, 2010; HETTICK et al., 2011).

As análises filogenéticas baseadas nos genes *URA5*, região ITS, *laccase*, entre outros (XU; VILGALYS; MITCHELL, 2000), possibilita inferir que *C. gattii* difere-se de *C. neoformans* (XU; VILGALYS; MITCHELL, 2000; MARRA et al., 2004). Desta maneira, a junção das técnicas filogenéticas e das metodologias moleculares, como, *Multilocus Sequence Typing* (MLST), PCR-RFLP, amplificação da região ITS do DNAr, entre outras, podem contribuir na diferenciação das leveduras em geral (KURTZMAN; FELL; BOEKOUT, 2011), por exemplo, *Cryptococcus* spp. (NYAZIKA et al., 2016).

As espécies e variedades de *Cryptococcus* não são isoladas de forma homogênea no mundo. *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) é a espécie mundialmente mais presente (MARTINEZ; GARCIA-RIVERA; CASADEVALL, 2001; FENG et al., 2008; LIN et al., 2008; LIAW; WU; HSUEH, 2009; AGUIAR et al., 2017), enquanto que *C. neoformans* var. *grubii* x *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo AD) e *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) são isoladas em menor quantidade em quase todos os continentes, apresentando menor frequência na Ásia, Oceania, América do Norte e América do Sul e maior frequência na Europa (TRILLES et al., 2008; MEYER; TRILLES, 2010). *C. gattii* foi inicialmente isolado de regiões tropicais e subtropicais (ELLIS; PFEIFFER, 1990; DA SILVA et al., 2008), mas atualmente estudos indicam que esta espécie apresenta ampla distribuição global, sendo encontrada em todos os continentes, incluindo regiões temperadas, como na Ilha Vancouver no Canadá, onde ocorreu um surto envolvendo essa levedura (SPRINGER; CHATURVEDI, 2010; HAGEN et al., 2015).

Os tipos moleculares de *Cryptococcus* spp. encontrados no mundo são VNI, VNII, VGI e VGII, sendo que os tipos moleculares isolados com mais frequência são VNI e VNII (TRILLES et al., 2008; SPRINGER; CHATURVEDI, 2010; MEYER; TRILLES, 2010; MATOS et al., 2012; COGLIATI, 2013b). No Brasil, estudos realizados por Trilles et al. (2008) mapearam a distribuição geográfica desses tipos

moleculares e relataram que os tipos moleculares mais isolados na macrorregião Norte foram VGII, VGIII, VNI e VNIV. Já os tipos moleculares mais frequentes na macrorregião Sul foram VGI, VGII, VGIII, VNI, VNII, VNIII e VNIV. Sendo que, os tipos moleculares isolados com maior frequência nessas duas regiões são VNI e VGII. Entretanto, o tipo molecular VNI é o mais prevalente entre eles e é relatado para o território brasileiro bem como em todos os continentes (Europa, Ásia, África, Oceania, América do Sul, América do Norte e América Central) (TRILLES et al., 2008; SPRINGER; CHATURVEDI, 2010; MEYER; TRILLES, 2010; MATOS et al., 2012; COGLIATI et al., 2013a). O único tipo molecular que não foi observado nessas regiões do Brasil foi VGIV (CORREA et al., 1999; SANTOS et al., 2008). Em estudos realizados por Meyer e Trilles (2010) e Cogliati (2013b) foi observada uma maior frequência do tipo molecular VGIV na África do Sul, e em uma menor frequência na Índia, Colômbia e México. Estudos mostram também uma maior frequência de isolados do tipo molecular VNIII e VNIV na Europa. Já o tipo molecular VGIII tem sido mais prevalente nos países da América Latina. De acordo com Freire et al. (2012), os tipos moleculares comumente isolados no estado do Amazonas são VNI, VNII e VGII. Já o tipo molecular VNII apenas não é encontrado na América Central (MEYER; TRILLES, 2010). O tipo molecular VNB foi inicialmente isolado em Botswana (LITVINTSEVA et al., 2005) e posteriormente em diferentes partes do mundo (OLIVEIRA et al., 2004; BOVERS et al., 2008; NGAMSKULRUNGROJ; MEYER, 2009) como Portugal, Brasil, Venezuela, Ruanda (BOVERS et al., 2008) e Itália (COGLIATI et al., 2013a). Estudos realizados por Meyer e Trilles (2010) relataram que o tipo molecular VGI é encontrado em menor frequência em todos os continentes, com exceção da Oceania, onde foi encontrado com maior frequência. Além disso, este tipo molecular foi observado na região Sudeste em um relato de caso de criptococose cutânea primária em paciente imunocompetente (NASCIMENTO et al., 2014).

C. laurentii vem sendo relatado na literatura como o mais frequente patógeno humano não-*neoformans* e não-*gattii* (KIDD et al., 2016) sendo que nas últimas décadas houve um aumento de casos de criptococose causadas por essa espécie (FELL et al., 2000; MANFREDI et al., 2006; SHANKAR et al., 2006; ANDRADE-SILVA et al., 2010; DANESI et al., 2014). Essa espécie já foi observada em países como, Brasil (ANDRADE-SILVA et al., 2010), China (WANG et

al., 2012), Austrália (XIAO et al., 2016) e Índia (GUPTA; MISHRA; SINGH, 2018), apresentando assim uma distribuição mundial, além de apresentar uma distribuição geográfica sobreposta em relação as espécies *C. gattii* e *C. neoformans* (MCCULLOH et al., 2011; LOCKHART et al., 2013; WARREN; AMORY; TOBIN, 2014).

1.3 – A CRIPTOCOCOSE

A infecção causada por espécies do gênero *Cryptococcus* é denominada criptococose o qual apresenta conotação sistêmica e oportunista, pois acomete em maior proporção indivíduos imunocomprometidos. Esses são indivíduos que apresentam algum tipo de doença transitória ou permanente, como portadores do *Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immunodeficiency Syndrome (HIV/AIDS)* (PAPPALARDO; MELHEM, 2003), pessoas que fazem uso de corticoides e aquelas com doenças de base como, diabetes, transplantados, doenças reumáticas, anemia falciforme, linfomas, entre outras. Além disso, essa infecção pode acometer também pessoas imunocompetentes (saudáveis) (ELLIS; PFEIFFER, 1990; PATTERSON, 2005; VERONESI, 2005; LEVITZ; BOEKHOUT, 2006; FENG et al., 2008; LIN et al., 2008; DA SILVA et al., 2008; ANAISSIE; MCGGINNIS; PFALLER, 2009; LIAW; WU; HSUEH, 2009; SOUZA et al., 2009; PAPPAS et al., 2010; AGUIAR et al., 2017). A principal via de infecção por *Cryptococcus* spp. no homem é por meio da inalação das leveduras dessecadas ou dos basidiósporos que estão presentes em diversas fontes ambientais. Com a inalação dessas leveduras, o primeiro sítio de infecção são os pulmões podendo, na dependência da resposta imune do paciente, causar pneumonia e se disseminar para outros sítios anatômicos do paciente (ELLIS; PFEIFFER, 1990; DA SILVA et al., 2008; SOUZA et al., 2009), principalmente o SNC, onde essas leveduras têm tropismos pelas células nervosas do indivíduo (VERONESI, 2005; DESALERMOS; KOURKOUMPETIS; MYLONAKIS, 2012; BOULWARE et al., 2014) (Figura 1).

Figura 1 – Ciclo da infecção por *Cryptococcus* spp.

Fonte: Adaptado de Lin e Heitman (2006).

Estudos realizados pelo Consenso em Criptococose (2008) indicam que esta infecção acomete cerca de 4% dos casos de pacientes descritos como aidéticos. Os pacientes com HIV, quando infectados com essa doença e em ambientes de recursos limitados, como na África Subsaariana apresentam uma taxa de mortalidade de 70% (PARK et al., 2009). Já no Brasil é observada uma taxa entre 42 e 60% de mortalidade (PAPPALARDO; PASCHOAL; MELHEM, 2007; FERREIRA-PAIM et al., 2017). Nos dados da Vigilância Epidemiológica da Criptococose de 2012 do Sistema de Internação Hospitalar do Sistema Único de Saúde (SIH-SUS) expostos pelo Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde, a criptococose foi relatada como a mais prevalente em termos de internação no período de 2000 a 2007 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

A infecção por *Cryptococcus* spp. é considerada invasiva, podendo acometer as meninges, precedida ou não da lesão pulmonar e a distribuição desse fungo através da corrente sanguínea (fungemia), pele, ossos, entre outros. Assim, a principal manifestação clínica da criptococose é meningite e/ou meningoencefalite grave com predisposição a disseminação, sendo que esta manifestação ocorre em 90% dos casos. Essa predisposição se deve ao fato deste fungo ter um “tropismo” pelas células que constituem o SNC do indivíduo (VERONESI, 2005; DESALERMOS; KOURKOUMPETIS; MYLONAKIS, 2012; BOULWARE et al., 2014). Desta maneira, as leveduras de *Cryptococcus* spp. atravessam a barreira hematoencefálica de forma transcelular, paracelular e por fagócitos infectados denominado “cavalo de Tróia”. Além disso, o tropismo pelo SNC é parcialmente explicado pela abundância de inositol no cérebro que causa a ligação do ácido

hialurônico presente na célula fúngica aos receptores CD44 do paciente (LÁZERA et al., 2005; LI; MODY, 2010; SRIKANTA; SANTIAGO-TIRADO; DOERING, 2014; TSENG et al., 2015).

A criptococose ocorre em todo o mundo e estima-se que afeta aproximadamente 220.000 indivíduos, provocando em torno de 180.000 mortes por ano. Os pacientes acometidos pela infecção causada pelo *Cryptococcus* sp. frequentemente apresentam a doença disseminada (SRICHATRAPIMUK; SUNGKANUPARPH, 2016; RAJASINGHAM et al., 2017). Embora essa micose não tenha predisposição para sexo ou raça, já foi observada uma maior predominância em indivíduos do sexo masculino (QUEIROZ et al., 2008; AGUIAR et al., 2017). Desta maneira, a criptococose tem sido considerada de grande importância na clínica e na epidemiologia (NUNES, 2013).

O complexo *C. neoformans* é o principal agente da criptococose e causador de infecção oportunista. Para o complexo *C. gattii* essa doença está associada à infecção primária e acomete preferencialmente pessoas imunocompetentes (saudáveis), incluindo crianças (ELLIS; PFEIFFER, 1990; CORREA et al., 1999; DA SILVA et al., 2008; SANTOS et al., 2008; TRILLES et al., 2008; MARTINS et al., 2011; CHEN; MEYER; SORRELL, 2014; DESNOS-OLLIVIER et al., 2015; ESPINEL-INGROFF; KIDD, 2015; AMBURGY et al., 2016; FARRER et al., 2016; LOCKHART et al., 2016; SOUTO et al., 2016; ACHESON et al., 2017; DA SILVA et al., 2017; NOGUERA; ESCANDON; CASTANEDA, 2017). Já para o complexo *C. laurentii* é considerado oportunista e assim como *C. neoformans*, causa infecções em indivíduos imunocomprometidos (KHAWCHAROENPORN; APISARNTHANARAK; MUNDY, 2007; BERNAL-MARTINEZ, et al., 2010; FERREIRA-PAIM, et al., 2014).

Os fatores de virulência considerados fundamentais para a patogênese desses fungos são: termotolerância, cápsula polissacarídica, melanina, as enzimas fosfolipase, peptidase e urease, além do tipo de acasalamento (GOLDMAN; LEE; CASADEVALL, 1994; STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003; KRONSTAD et al., 2011; KWON-CHUNG et al., 2014; BIELSKA; MAY, 2016). Os fatores de virulência mais estudados e explorados são a termotolerância, a cápsula polissacarídica e a melanina (BIELSKA; MAY, 2016), sendo a cápsula polissacarídica considerada o principal fator de virulência deste fungo (MCCLELLAND; BERNHARDT; CASADEVALL, 2005). Ainda que todas as espécies de *Cryptococcus* patogênicas apresentem esses fatores de virulência, há algumas diferenças que são

consideradas importantes e que podem influenciar na hipervirulência de *C. gattii*, especialmente do tipo molecular VGII (O'MEARA; ALSPAUGH, 2012).

A cápsula é formada basicamente por dois polissacarídeos, a GXM e a galactoxilomanana (GalXM). GXM é o principal componente da cápsula polissacarídica (90-95%) enquanto que a GalXM constitui cerca de 5-8% da massa capsular. Estes componentes são compostos de galactose, ácido glucurônico, xilose e manose (VARTIVARIAN et al., 1989; MITCHELL; PERFECT, 1995; HULL; DAVIDSON; HEITMAN, 2002; KWON-CHUNG; VARMA, 2006; DEL PETA; CASADEVALL, 2012). A síntese dos polissacarídeos, de modo geral, ocorre no lado externo da membrana plasmática do fungo ou até mesmo no espaço extracelular (FELDMESSER, KRESS; CASADEVALL, 2001; GARCIA-RIVERA et al., 2004; YONEDA; DOERING, 2006), sendo que, a maior parte desses polissacarídeos são secretados pelas vesículas extracelulares (DE JESUS et al., 2009). Para os fungos patogênicos, a vesícula extracelular (VE) é um mecanismo importante no transporte de moléculas (BROWN et al., 2015), através do qual ocorre o transporte de vários fatores de virulência que podem contribuir para a patogenicidade fúngica e na modulação da resposta imune do hospedeiro (RODRIGUES et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010; VARGAS et al., 2015; DA SILVA et al., 2016).

A cápsula polissacarídica apresenta funções importantes, como a atividade antifagocitária que facilita a instalação do fungo nos tecidos do hospedeiro, aumentando sua disseminação para outros sítios anatômicos (GOLDMAN; LEE; CASADEVALL, 1994). Além disso, possui efeitos imunomoduladores que auxiliam na evasão do sistema imune (VECCHIARELLI, 2000; STEENBERGEN, SHUMAN; CASADEVALL, 2001; MONARI; BISTONI; VECCHIARELLI, 2006). A GalXM possui funções pouco conhecidas, mas já foi observado que este polissacarídeo é capaz de inibir a proliferação de células T, sendo observada a ativação da apoptose de linfócitos T (PERICOLINI et al., 2006; DE JESUS et al., 2007) e macrófagos (VILLENNA et al., 2008).

A melanina, outro fator que contribui para virulência do fungo, é um pigmento carregado negativamente onde são polimerizados a partir de compostos difenólicos e/ou fenólicos (BUTLER; DAY, 1998; ROSAS et al., 2000). Este é um dos principais pigmentos naturais sintetizado por membros de todos os reinos, abrangendo uma enorme variedade de fungos, bactérias e helmintos que causam infecções em humanos (NOSANCHUK; STARK; CASADEVALL, 2015). Assim, quando as

leveduras de *Cryptococcus* spp. crescem em meios de cultura ágar L-dopa, meio de cultura ágar ácido caféico, entre outros, apresentam-se frequentemente como colônias de cor marrom a preto. Devido a isso, a produção de melanina é uma das características utilizadas para a identificação em laboratórios do complexo de *C. neoformans* e *C. gattii* (JACOBSON; HOVE; EMERY, 1995; LACAZ et al., 2002; HERNÁNDEZ et al., 2003; NANDHAKUMAR et al., 2006). *C. laurentii* e *C. albidus* também produzem melanina, mas de forma menos acentuada do que observado em *C. neoformans* e *C. gattii* (IKEDA et al., 2002; PEDROSO et al., 2007).

O pigmento melanina é considerado hidrofóbico, de alto peso molecular e está associado na maioria das vezes a proteínas e carboidratos (BUTLER; DAY, 1998; ROSAS et al., 2000). Os fungos podem produzir melanina a partir de substratos endógenos, através da via 1,8-dihidroxinaftaleno (DHN) intermediário. Porém, alguns fungos sintetizam melanina através da via L-3,4-di-hidroxifenilalanina (L-dopa), como por exemplo, *C. neoformans*, *C. gattii* (BRILHANTE et al., 2017) e *C. laurentii* (SCHIAVE et al., 2009). A lacase e/ou fenol-oxidase é a enzima que catalisa a maior parte da biossíntese da melanina e é encontrada na parede celular do fungo. Sua sequência genética é muito utilizada na construção de *primers*, os quais são utilizados na identificação molecular dos sorotipos do complexo *C. neoformans* e *C. gattii* (ROSAS et al., 2000; ITO-KUWA et al., 2008; LIAW; WU; HSUEH, 2009). Desta maneira, este pigmento presente nas células leveduriforme de *Cryptococcus* sp. apresentam a função de proteção contra diversos fatores como os danos oxidativos causados pelos fagócitos e proteção contra a ação de antifúngicos, além de contribuir contra o estresse ambiental, como a luz ultravioleta (UV) e a radiação ionizante (KWON-CHUNG; RHODES, 1986; BUTLER; DAY, 1998; VAN DUIN; CASADEVALL; NOSANCHUK, 2002; ITO-KUWA et al., 2008; LIAW; WU; HSUEH, 2009; EISENMAN; CASADEVALL, 2012).

Diferentes modelos *in vivo* vêm sendo utilizados no estudo da virulência dos fungos que causam a criptococose, como os modelos animais vertebrados camundongos, ratos e coelhos (GOLDMAN et al., 1996; CARROLL; GUILLOT; QURESHI, 2007; SABIITI; MAY; PURSALL, 2012). Além disso, modelos animais alternativos como *Galleria mellonella* e *Caenorhabditis elegans* são empregados para avaliar a virulência e eficácia do tratamento antifúngico em *C. neoformans* (MYLONAKIS et al., 2002; GARCIA-RODAS et al., 2011; GARCIA-SOLACHE et al., 2013; TREVIJANO-CONTADOR et al., 2015), *C. gattii* (BYRNES et al., 2009; CHEN

et al., 2013; FIRACATIVE; DUAN; MEYER, 2014), *Candida albicans* (BRENNAN et al., 2002; DUNPHY et al., 2003), *Candida krusei* (SCORZONI et al., 2013) e *Aspergillus fumigatus* (JACKSON; HIGGINS; LIN, 2009). *Galleria mellonella* é uma espécie de inseto que pertence ao reino *Animalia*, filo *Arthropoda*, classe *Insecta*, ordem *Lepidoptera*, família *Pyralidae*, subfamília *Galleriinae* e tribo *Galleriini* (LINNAEUS, 1758; DE JONG et al., 2014). Este inseto é popularmente conhecido como a traça grande da cera e considerado uma praga em colmeias de abelhas (VILLAS, 2006), pois as larvas deste inseto se alimentam de cera, mel e pólen, nutrientes comumente encontrados nas colmeias de abelhas (VANDENBERG; SHIMANUKI, 1990). As larvas apresentam o ciclo de vida rápido e completo, sendo representados por quatro estágios: (i) ovo; (ii) larva; (iii) pupa; (iv) adulto (VILLAS, 2006). Embora essas larvas sejam consideradas pragas para os apicultores (VILLAS, 2006), elas vêm sendo amplamente utilizadas (durante seu último estágio larval) como modelo animal alternativo de infecção para avaliar a virulência de vários microrganismos patogênicos (MYLONAKIS et al., 2005), como, fungos e bactérias (COOK, MCARTHUR, 2013; HORNSEY et al., 2013; WAND et al., 2013; BEETON et al., 2015). *G. mellonella* apresenta várias vantagens quanto ao seu uso experimental, por exemplo, são fáceis de manipular, apresentam baixo custo de manutenção e as larvas podem ser mantidas sob várias condições de temperatura que podem variar entre 25° a 37°C, sendo que a temperatura a 37°C é uma condição importante para a patogênese do fungo (MYLONAKIS et al., 2005; FIRACATIVE; DUAN; MEYER, 2014; FUCHS et al., 2017). Além disso, não existem limitações éticas quanto ao uso da *G. mellonella* (FIRACATIVE; DUAN; MEYER, 2014) e apresentam sistema imune inato análogo ao de vertebrados (KAVANAGH; REEVES, 2004). Contudo, o uso de modelos animais alternativos não elimina totalmente a necessidade do uso de modelos animais vertebrados, por isso, esses modelos animais alternativos são utilizados como uma “triagem” para rastrear microrganismos que possam ser considerados relevantes e então serem transferidos para modelos de animais vertebrados, a fim de um estudo mais aprofundado (FUCHS et al., 2017).

1.4 - SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS E TRATAMENTO DA CRIPTOCOCOSE

Os estudos relacionados à susceptibilidade aos antifúngicos tem sido de grande interesse para a comunidade científica (BANERJEE; SHANNON, 2001; CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008), principalmente devido ao aumento de infecções ocorridas por fungos em geral. Esse aumento está associado principalmente a indivíduos que possuem fatores que predispõem ao desenvolvimento de infecção, em especial os indivíduos imunocomprometidos e/ou aquele que já tenha alguma doença de base, seja esta adquirida ou induzida (BANERJEE; SHANNON, 2001). Além disso, o uso indiscriminado e por longos períodos de antimicrobianos de amplo espectro vem selecionando fungos com resistência aos antifúngicos (DIAS et al., 2006). Adicionalmente, a utilização de fungicidas da classe dos azoles (propiconazol, tebuconazol, difenconazol, epoxiconazol e bromuconazol) na agricultura pode levar à pressão seletiva de fungos expostos a esses fungicidas, contribuindo, assim, a seleção de cepas fúngicas resistentes aos antifúngicos utilizados na clínica (TAKAHASHI; MELHEM, 2014; HOLLOMON, 2017). Desta forma, a resistência intrínseca ao fungo está se tornando um problema crescente (CHEONG; MCCORMACK, 2013; SMITH et al., 2015). Existem várias técnicas utilizadas para a determinação da susceptibilidade *in vitro* dos fungos aos antifúngicos, como por exemplo, o método de microdiluição em caldo. Essa metodologia é realizada seguindo as orientações do protocolo M27-A3 e suplemento M27-S3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Esse documento tem o intuito de padronizar e facilitar a comparação dos resultados entre diferentes laboratórios (CLSI, 2008).

As classes de antifúngicos que são utilizados na clínica para o tratamento de criptococose são os poliênicos (anfotericina B), os azóis (itraconazol, fluconazol, voriconazol e cetoconazol) e um derivado de pirimidina (5-flucitosina). Porém, a 5-FC ainda não está disponível no Brasil (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008; PERFECT et al., 2010; CHEONG; MCCORMACK, 2013; SMITH et al., 2015).

A anfotericina B (AMB) é um antifúngico da classe dos poliênicos que foi descoberto em 1956 (DISMUKES, 1993). Apesar de apresentar ação de amplo espectro, este antifúngico é considerado muito tóxico, sendo preferencialmente

utilizado em tratamento de infecção fúngica sistêmica. A administração desse medicamento é realizada somente por via intravenosa e o seu uso está sempre associado com outro antifúngico (GOLD et al., 1956; VANDEPUTTE; WACHTEL; STILLER, 1956; SIDRIM; MOREIRA, 1999). O mecanismo de ação que este fármaco possui está ligado ao ergosterol da membrana plasmática das células fúngicas, promovendo um desarranjo e formando canais ou poros que são capazes de alterar a permeabilidade celular. Através desses canais ou poros ocorre o extravasamento do conteúdo intracelular, causando a perda de pequenas moléculas (KNOLLMAN, 2012). Estudos realizados mostraram que a resistência a este antifúngico já vem sendo observada em alguns isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. (KELLY et al., 1994; SILVA; COLS, 2008; ANDRADE-SILVA et al., 2013; JÚNIOR, 2016; KIDD et al., 2016).

Os antifúngicos fluconazol (FLU), itraconazol (ITR), voriconazol (VOR) e cetoconazol (CET) apresentam uma ação de largo espectro e toxicidade reduzida (PALLISTER; WARNOCK, 1989). Atuam especificamente na biossíntese do ergosterol, que é um dos principais componentes da membrana plasmática fúngica (KNOLLMAN, 2012). Esses fármacos são utilizados em tratamento de micoses superficiais, mucocutâneas e sistêmicas (CHEN; SOBEL, 2005). O FLU é o composto mais utilizado no tratamento da criptococose, sendo indicado nas fases de consolidação e manutenção do tratamento (PERFECT et al., 2010). Entretanto, o uso prolongado desses antifúngicos promoveu o surgimento de resistência de vários fungos patogênicos, como *C. neoformans* (MAGALHÃES et al., 2015). No caso do FLU, desde 1994 vem sendo observado um aumento significativo de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. resistentes a esse antifúngico (PAUGAM et al., 1994; FRIESE et al., 2001; ALVES; GRIEBELER; GOULART, 2002; KHAWCHAROENPORN; APISARNTHANARAK; MUNDY, 2007; KIDD et al., 2016; MPOZA; RHEIN; ABASSI, 2018). Para o ITR também vem sendo relatado casos de resistência (ESPINEL-INGROFF et al., 2012b; KIDD et al., 2016). Já para o VOR é observado na literatura que este antifúngico ainda se demonstra eficaz contra as espécies de *Cryptococcus* (ESPINEL-INGROFF et al., 2012b; HERKERT et al., 2016; KIDD et al., 2016; HERKERT et al., 2018).

A 5-flucitosina (5-FC) é um análogo da pirimidina que foi criada em 1957 e utilizada como agente antitumoral. Em 1968 foi utilizada pela primeira vez no tratamento de criptococose e candidíase (BENNETT, 1977; LOYSE et al., 2013). É

um fármaco cuja administração é sempre associada a outro antifúngico, apresentando poucos efeitos colaterais. Este antifúngico é considerado um “falso nucleotídeo”, pois penetra na célula fúngica por intermédio da citosina deaminase, sendo, em seguida, convertido em 5-fluororacil. Este composto tem a função de inibir a enzima timidilato sintetase o qual interfere na síntese de DNA e de proteínas das células fúngicas (KNOLLMAN, 2012). Desde o início da utilização deste antifúngico, vem sendo relatado isolados clínicos resistentes a esse fármaco (LÁZERA et al., 2005; KHAWCHAROENPORN; APISARNTHANARAK; MUNDY, 2007; KIDD et al., 2016), embora sua utilização associada com AMB tenha comprovado um tratamento altamente eficaz (LÁZERA et al., 2005).

O tratamento da infecção ocasionada por fungos do gênero *Cryptococcus* vem sendo o alvo de muitos estudos (SLOAN; PARRIS, 2014). Este tratamento varia de acordo com a extensão da doença, gravidade e a imunidade do hospedeiro (SRICHATRAPIMUK; SUNGKANUPARPH, 2016). A *World Health Organization* (2011) preconiza, com intuito de otimizar a sobrevivência do indivíduo, que o tratamento para a criptococose com o quadro clínico de meningite seja de início com AMB com ou sem a associação da 5-FC. As formas leves da criptococose, onde não ocorre o envolvimento no SNC, normalmente são tratadas com FLU via oral com dose de 400 mg por dia em um período de 6 a 12 meses, além disso, também é preconizado esta mesma dose e duração no tratamento da criptococose para o antifúngico ITR. Adicionalmente, o ITR mostra ser mais eficaz no controle da infecção de pacientes com quadros clínicos de infecção por *Cryptococcus* spp. nos pulmões e ossos (DISMUKES, 1993; ALVES et al., 1997; PERFECT; COX, 1999; SAAG et al., 2000; PERFECT et al., 2010). Estudos realizados por Bicanic et al. (2008) mostraram que o aumento da dose de AMB para 1 mg/kg por dia, associado a dose de 100 mg/kg ao dia de 5-FC, apresenta maior atividade fungicida e redução dos efeitos colaterais. Embora este último ainda não esteja disponível no Brasil (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008; PERFECT et al., 2010; CHEONG; MCCORMACK, 2013; SMITH et al., 2015), a 5-FC é considerada uma alternativa terapêutica no tratamento da criptococose (GHANNOUM; RICE, 1999; MORACE; PERDONI; BORGHI, 2014).

Os pacientes portadores do vírus HIV apresentam maior prevalência no desenvolvimento da criptococose e são tratados com a terapia inicial de AMB, com ou sem associação com a 5-FC, seguido da monoterapia de manutenção com FLU

(DISMUKES, 1993; ALVES et al., 1997; PERFECT; COX, 1999; SAAG et al., 2000; PERFECT et al., 2010). Embora existam diferenças significativas entre as espécies de *Cryptococcus*, o tratamento com os antifúngicos ainda são os mesmos. Porém, alguns especialistas sugerem que o tratamento das infecções causadas por *C. gattii* seja mais prolongado na indução e na consolidação. A fase de indução é preferencialmente realizada por dois antifúngicos, já as fases de consolidação e manutenção devem ser preferencialmente pela monoterapia com o FLU (FENG et al., 2008; LIN et al., 2008; LIAW; WU; HSUEH, 2009; TRILLES et al., 2014; SRICHATRAPIMUK; SUNGKANUPARPH, 2016).

Com base nessas informações é observado que o número de opções terapêuticas disponíveis é bastante limitado frente a gravidade e relevância da criptococose na saúde pública (FRIESE et al., 2001; ESPINEL-INGROFF et al., 2012a; ESPINEL-INGROFF et al., 2012b). Além disso, na literatura já vem sendo relatada a ocorrência de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. resistentes aos antifúngicos utilizados na clínica (KIDD et al., 2016) e isso dificulta cada vez mais o tratamento desta infecção (FRIESE et al., 2001; ESPINEL-INGROFF et al., 2012a; ESPINEL-INGROFF et al., 2012b). Por isso, é necessária a identificação de novos alvos terapêuticos, com o intuito de auxiliar no tratamento da criptococose (BAHN; JUNG, 2013).

Diante do exposto acima, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar e correlacionar os isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. da região Nordeste do estado de São Paulo para melhor compreensão da patogenia, virulência e susceptibilidade aos antifúngicos.

2 - JUSTIFICATIVA

O número de casos de indivíduos acometidos por criptococose vem crescendo devido ao aumento populacional de indivíduos imunocomprometidos, principalmente aqueles portadores do *Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immunodeficiency syndrome* (HIV/AIDS), entre outras doenças de base. As principais espécies responsáveis por causar essa doença em humanos são *C. neoformans* e *C. gattii*. Porém, já são observadas na literatura outras espécies deste gênero capazes de causar essa infecção, como por exemplo, *C. laurentii*.

Esta doença está relacionada a áreas rurais, urbanas e florestais. Essa infecção é considerada uma doença sistêmica e/ou crônica de característica oportunista devido a sua maior predisposição em acometer indivíduos imunocomprometidos. Porém, na literatura também é relatada a ocorrência desta infecção em indivíduos imunocompetentes. A principal manifestação clínica desta doença em humanos é a meningoencefalite subaguda e/ou crônica, pois, este fungo tem tropismo pelas células nervosas do sistema nervoso central do indivíduo. Além disso, também tem sido relatada a ocorrência de diversidade na manifestação e na evolução clínica da criptococose tanto em indivíduos imunocomprometidos (principalmente aqueles portadores do vírus HIV/AIDS), quanto em indivíduos imunocompetentes. Desta maneira, é necessário um tratamento terapêutico rápido e com auxílio de antifúngicos. Apesar disso, ainda é observado uma taxa alta de óbitos e sequelas graves naqueles indivíduos que sobrevivem à infecção.

A persistência da doença criptocócica e a má evolução nos indivíduos decorrem de dois principais fatores, o hospedeiro acometido e o patógeno que causou a doença. Sendo assim, a progressão da doença varia de acordo com o status imune do hospedeiro e dos fatores de virulência do patógeno. Portanto, esse estudo teve o objetivo de analisar os isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. oriundos de pacientes com criptococose do HCFMRP-USP o qual recebe pacientes da cidade de Ribeirão Preto e macrorregião. Com este estudo foi possível conhecer as espécies e os tipos moleculares, além dos fatores de virulência, a virulência e a susceptibilidade aos antifúngicos destes isolados clínicos. Contribuindo para o conhecimento e para a melhora da terapêutica e conduta médica nestes casos.

Diante do exposto acima, é de suma importância comparar e correlacionar às características moleculares e fenotípicas de *Cryptococcus* spp. para melhor compreensão da patogenia, virulência e susceptibilidade aos antifúngicos dessas leveduras encapsuladas.

3 - OBJETIVO GERAL

Estudar amostragem retrospectiva por conveniência do período de 2012 a 2017 de isolados clínicos de pacientes com criptococose oriundos do HCFMRP-USP, na cidade de Ribeirão Preto e respectiva macrorregião.

3.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter os dados contidos nos formulários dos pedidos de exames micológicos, de livre acesso do laboratório do HCFMRP-USP;
- Determinar por métodos moleculares as espécies e os tipos moleculares dos isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.;
- Estudar os fatores de virulência (cápsula polissacarídica e melanina) *in vitro* e a virulência *in vivo* no modelo animal alternativo *Galleria mellonella* dos isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.;
- Determinar a susceptibilidade *in vitro* dos isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. aos antifúngicos (AMB, FLU, ITR, VOR e 5-FC);
- Comparar e correlacionar as características moleculares e fenotípicas dos isolados clínicos para melhor compreensão dos diferentes casos clínicos de criptococose.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - LOCAL DE ESTUDO

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia Clínica (LMC) e Laboratório de Expressão Gênica e Proteômica de Fungos Filamentosos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP) e no Laboratório de Micologia Clínica da área de Moléstias Infecciosas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMR-USP). Para este trabalho foram utilizados os isolados clínicos *Cryptococcus* spp. provenientes do HCFMRP-USP.

4.2 - COMITÊ DE ÉTICA

Este projeto foi realizado sob a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCFRP-USP, pelo protocolo CEP/FCFRP nº 438 – CAAE nº 65087117.8.0000.5403, na 165ª reunião ordinária realizada em 12/06/2017, conforme parecer consubstanciado do CEP nº 2.134.786 (Anexo A). Diante disso, o CEP do HC sendo instituição coparticipante, está ciente de suas responsabilidades com seu compromisso no resguardo da segurança e bem estar dos sujeitos desta pesquisa, concordando com a Instituição proponente, que cumpre as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução 466/12 (Anexo B). Devido a este projeto ter colaboração em outro projeto no HC, foi incluído o CEP do HC de acordo com o processo HCRP nº 12247/2010. Este comitê segue integralmente a conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a resolução nº 196/96 CNS/MS (Anexo C).

4.3 - ISOLADOS CLÍNICOS DE PACIENTES COM CRIPTOCOCOSE

Neste estudo foi analisado um total de 132 isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. provenientes de 80 pacientes. Essa amostragem foi retrospectiva por conveniência do período 2012 a 2017. As linhagens foram isoladas de diferentes

materiais biológicos como, biópsia de pele e gânglio, medula óssea, escarro espontâneo e escarro induzido, urina (sonda), lavado bronco alveolar, sangue e líquido cefalorraquidiano. Os isolados clínicos foram identificados previamente no HCFMRP-USP através de métodos clássicos como, confirmação de cápsula em exame direto com ou sem adição de corante (tinta nanquim), testes bioquímicos de degradação de ureia, assimilação de açúcares e sistema automatizado VITEK® (bioMérieux, Brasil).

Os isolados clínicos são mantidos no Laboratório de Microbiologia do HCFMRP-USP em tubos contendo meio de cultura ASD (Acumedia *Neogen*®, Brasil) armazenados em temperatura ambiente, sendo realizadas transferências trimestrais para outros tubos contendo ASD com cloranfenicol. Além disso, também estão armazenados em meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI) 20% glicerol a -80°C, deste hospital. No Laboratório de Micologia Clínica e Laboratório de Expressão Gênica e Proteômica de Fungos Filamentosos da FCFRP-USP, esses isolados clínicos estão armazenados em meio de cultura BHI 20% glicerol a -80°C na coleção de fungos do Laboratório de Micologia Clínica (LMC) da FCFRP-USP. Todos os isolados clínicos foram cedidos pelo Prof. Dr. Roberto Martinez, coordenador do Laboratório de Microbiologia do HCFMRP-USP.

4.4 - DADOS REFERENTES AOS PACIENTES COM CRIPTOCOCOSE

Nesta pesquisa foram estudados 80 pacientes que apresentaram quadro clínico de criptococose. Os dados referentes aos pacientes com o sorotipo HIV positivo/negativo foram obtidos nos prontuários médicos do HCFMR-USP. Os dados clínicos (doenças subjacentes, fatores predisponentes, quadro clínico e evolução da doença) e dados demográficos (idade, gênero, naturalidade e procedência) foram coletados apenas dos pacientes sorotipo HIV negativo. Todos os dados clínicos foram cedidos pelo Prof. Dr. Roberto Martinez, coordenador do Laboratório de Microbiologia do HCFMRP-USP.

4.5 - IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Para identificação molecular de todos os isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. foram analisadas, inicialmente, a pureza e viabilidade de todos esses isolados clínicos obtidos do HCFMRP-USP. Para isto, foram realizados repiques dessas leveduras em placas de Petri 90 x 15 mm (Olen) contendo meio de cultura ASD e posteriormente incubados a 37°C (Solab–bacteriológica SL–101) por 48 horas. Após a verificação visual da pureza e viabilidade dessas leveduras, as células recém-multiplicadas foram transferidas para tubos cônicos de 50 mL contendo 20 mL do meio de cultura *Yeast Extract Peptone Dextrose* (YPD) (2% de glicose [Sigma], 2% de peptona [Kasvi] e 1% de extrato de levedura [BD]) e incubadas a 37°C sob agitação constante de 200 rpm (Shaker *Ecotron–Infors* HT–Switzerland) por 48 horas. Posteriormente, os tubos cônicos foram centrifugados a 14000 *g* por 10 minutos a 37°C (Eppendorf, Alemanha). Em seguida, com o auxílio de uma micropipeta o sobrenadante foi retirado, o sedimento imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C até a extração do material genético.

4.5.1 - Extração do DNAg, tratamento com RNase, quantificação e eletroforese em gel de agarose

Para a extração do DNA genômico (DNAg) de todos os isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. foram utilizadas as leveduras congeladas em tubos cônicos de 50 mL. As leveduras congeladas foram ressuspensas em igual volume de tampão de extração de DNA (200 mM de Tris–HCl [Anidrol], pH 8,5, 250 mM de NaCl [Honeywell/Fluka®], 25 mM de EDTA pH 8 [Bio Rad], 0,5% (m/v) de SDS [Promega] e 2% (v/v) de Triton X100 [Sigma-Aldrich®]), homogeneizadas em leve agitação no vortex (*Mixer–Labnet International–Inc*) e transferidas para microtubos de 2-mL contendo pérolas de vidro previamente tratadas (AUSUBEL et al., 1993). Com o intuito de facilitar o rompimento da parede celular, os microtubos foram agitados em vortex (*Mixer–Labnet International, Inc*) por 30 segundos e incubados em banho seco (*Dry Bath Incubator–Boekel Scientific*) a 70°C por 10 minutos. Esse procedimento foi repetido três vezes em intervalo de 10 minutos cada. Após a incubação, o sobrenadante foi separado das pérolas de vidro pela transferência para novo

microtubo de 2-mL no qual foi adicionado 200 μ L de fenol (Sigma *Life Science*, EUA) e clorofórmio (JT Baker, EUA) (1:1) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 2001) e centrifugados a 16100 *g* por 15 minutos a 4°C. Após, o sobrenadante foi transferido para novo microtubo de 1,5-mL, onde foi adicionado mesmo volume de clorofórmio (JT Baker, EUA) e centrifugados a 16100 *g* por 5 minutos a 4°C para remoção de resíduo de fenol e/ou clorofórmio. Subsequentemente, o sobrenadante foi transferido para novo microtubo de 1,5-mL, no qual foi adicionado mesmo volume de isopropanol (Emsure[®] Sigma Aldrich, Alemanha) e imediatamente incubados a -20°C *overnight* para a precipitação dos ácidos nucleicos. Após a incubação, os microtubos foram centrifugados a 16100 *g* por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado, foram adicionados 1000 μ L de etanol 70% gelado (Ensure[®]) em cada microtubo e novamente centrifugados a 16100 *g* por 1 minuto a 4°C. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o resíduo de etanol foi evaporado em temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas. Cada amostra de DNA foi eluída com água esterilizada (*Nuclease Free Water*—Promega) e tratadas com 300 ng mL⁻¹ de RNase (*Pure Link RNase A-Invitrogen™ Thermo Fisher*[®]) a 37°C por aproximadamente 1 hora para retirar o RNA presente no material extraído. O material foi armazenado a 4°C.

A quantificação do DNAg foi realizada pela medida da absorbância em espectrofotômetro (*Nanophotometer Implen*[®], Alemanha) nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm. A relação das densidades ópticas (DO) obtidas nestes comprimentos de onda (DO₂₆₀/DO₂₈₀) indicam a pureza do DNAg. Assim, uma amostra de DNAg pura tem seus valores entre 1,8 a 2. Valores abaixo de 1,6 podem indicar presença de proteína e outros contaminantes. Nesse caso, é recomendado fazer a purificação do DNAg com o Kit *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) ou uma nova extração do DNAg.

Para verificar a integridade do DNAg extraído, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) (*UltraPure™*—Invitrogen) em tampão TAE 1X (200 mM de Tris Base [Promega] com pH 8,5, 250 mM de NaCl [Honeywell—Fluka[®]], 25 mM EDTA [Bio Rad] com pH 8,0) e o intercalante fluorescente de cadeia de ácidos nucleicos (SYBR SAFE[®]—Invitrogen). Após a eletroforese, o gel foi visualizado no aparelho *transiluminador PhotoDoc-It™—Imaging System* (UVP-LCC, EUA) de luz ultravioleta e fotografado pelo sistema de captação de imagens do próprio aparelho. O marcador de pares de bases utilizado para esta análise foi 1 kb DNA *Ladder* (Sinapse Inc, Brasil).

4.5.2 - Determinação das espécies de *C. neoformans* e *C. gattii* por PCR

Para a determinação das espécies de *C. neoformans* e *C. gattii* foram utilizados dois tipos específicos de pares de *primers*. Para a determinação da espécie *C. neoformans* foram utilizados os *primers* CNa-70-A (5' ATT GCG TCC ATG TTA CGT GGC 3') e CNa-70-S (5' ATT GCG TCC ACC AAG GAG CTC 3'), com o tamanho de fragmento amplificado de 695 pb e para *C. gattii* foram CNb-49-A (5' ATT GCG TCC ATC CAA CCG TTA TC 3') e CNb-49-S (5' ATT GCG TCC AAG GTG TTG TTG 3'), com o tamanho de fragmento amplificado de 448 pb (AOKI et al., 1999).

As PCRs foram realizadas com um volume final de 25 µl, contendo 1 µg de DNAg, tampão da enzima 1X, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP (Promega), 0,4 picomoles de cada *primer* e 1,25 U da enzima GoTaq[®] DNA *polymerase*-Hot Start (Promega, EUA). As condições das reações foram as mesmas para os dois pares de *primers* utilizados. Desta maneira, para a desnaturação inicial 94°C por 10 minutos, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, anelamento com temperatura de 55°C por 1 minuto e extensão de 72°C por 1 minuto, seguido de extensão final de 72°C por 10 minutos. Como controle negativo da reação foi utilizado um microtubo de 0,2-mL contendo todos os reagentes exceto o DNAg e para o controle positivo foram utilizadas as linhagens controle *American Type Culture Collection* (ATCC), previamente genotipadas como *C. neoformans* var. *grubii* (ATCC[®]90112[™]) e *C. gattii* (ATCC[®]32269[™]). Os produtos das PCRs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% (p/v) (UltraPure[™]-Invitrogen) e o marcador de pares de bases utilizado foi o de 100 pb DNA *Ladder* (Sinapse Inc, Brasil).

4.5.3 - Determinação dos tipos moleculares de *C. neoformans* e *C. gattii* por PCR-RFLP

Para a determinação dos tipos moleculares do complexo *C. neoformans* e *C. gattii* foi realizada a *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) precedida de uma PCR. A PCR-RFLP foi obtida através da amplificação por PCR do gene *URA5*, baseadas nas metodologias descritas por Meyer et al. (2003) com algumas modificações de acordo com Meyer e Trilles (2016). Com esse método foi possível

analisar oito tipos moleculares das espécies *Cryptococcus*, correspondendo a quatro tipos moleculares para cada espécie: *C. neoformans* (VNI – VNIV) e *C. gattii* (VGI – VGIV) (MEYER et al., 2003; AGUIAR, 2015) (Tabela 1).

Tabela 1 – Nomenclatura clássica dos complexos *C. neoformans* e *C. gattii*.

Espécies	Sorotipos e Variedades	Tipos Moleculares
<i>C. neoformans</i>	A (var. <i>grubii</i>)	VNI, VNII
	D (var. <i>neoformans</i>)	VNIV
	AD (var. <i>grubii</i> X var. <i>neoformans</i>)	VNIII
<i>C. gattii</i>	B	VGI, VGII e VGIII
	C	VGIV

Fonte: Adaptado de Meyer et al. (2003).

Os *primers* utilizados para amplificar o gene *URA5* foram *URA5* (5' ATG TCC TCC CAA GCC CTC GAC TCC G 3') e *SJ01* (5' TTA AGA CCT CTG AAC GTA CTC 3') (MEYER et al., 2003). As linhagens controle de cada tipo molecular (VNI - VNIV e VGI - VGIV) foram cedidas pelo Prof. Dr. Reginaldo dos Santos Pedroso, atualmente professor na Universidade Federal de Uberlândia (AGUIAR et al., 2017).

As PCRs foram realizadas com um volume final de 25 µl, contendo 0,25 µg a 0,5 µg de DNAg, tampão de enzima 1X, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP (Promega), 3,5 picomoles de cada *primer* e 0,2 µl de 5 U da enzima GoTaq® DNA polymerase–Hot Start (Promega, EUA). As condições da reação foram para a desnaturação inicial 94°C por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, anelamento com temperatura de 60°C por 1 minuto e extensão de 72°C por 1 minuto, seguido de extensão final de 72°C por 7 minutos. O controle negativo da reação foi preparado utilizando todos os reagentes da reação exceto o DNAg e para o controle positivo foram utilizadas as linhagens controle que identificam os tipos moleculares *C. neoformans* (VNI - VNIV) e os tipos moleculares *C. gattii* (VGI - VGIV). Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% (p/v) (UltraPure™–Invitrogen) com tamanho de fragmento de 850 pb (MEYER et al., 2003).

Os produtos amplificados foram submetidos à restrição enzimática com as endonucleases de restrição *HhaI* (Invitrogen–*Thermo Fisher*) e *Cfr13I* (Invitrogen–*Thermo Fisher*). Para isto, foi preparado um *mix* contendo um volume final de 4 µl, contendo 0,4 µl de tampão 10X (*red buffer*), 0,6 µl da enzima *Cfr13I* (5 U/µl) e 0,3 µl da enzima *HhaI* (10 U/µl) e 2,7 µl de água esterilizada. Foi adicionado neste *mix*, 15 µl do produto da PCR, 11 µl de água esterilizada, obtendo um volume final de 30 µl. Os microtubos foram homogeneizados em *vortex* (*Mixer–Labnet International, Inc*) e incubados em banho seco a 37°C (*Dry Bath Incubator–Boekel Scientific*) por 3 horas. Em seguida, os fragmentos obtidos foram separados em eletroforese em gel de agarose 3% (p/v) (UltraPure™–Invitrogen) em eletroforese a 100 V por 2 horas. As linhagens controle dos tipos moleculares VNI a VNIV e VGI a VGIV foram utilizadas como referência para interpretação e análise dos resultados de todos os isolados clínicos. O controle negativo da reação foi realizado sem o DNAg para eliminar qualquer suspeita de contaminação da reação.

4.5.4 – Determinação das espécies de *Cryptococcus* pela amplificação e sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal

O sequenciamento da região ITS do DNAr foi realizado apenas para os isolados clínicos que necessitavam da confirmação da espécie e as linhagens controle que foram utilizadas na identificação dos tipos moleculares das espécies de *Cryptococcus*. Para a amplificação da região ITS do DNAr foram utilizados os *primers* ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (WHITE et al., 1990). As PCRs foram realizadas com o volume final de 20 µl, contendo 1 µg de DNAg, tampão de enzima GC 1X, 0,2 mM dNTP, 0,5 picomoles de cada *primer* (ITS1 e ITS4), 3% (v/v) DMSO (Promega) e 1,25 U da enzima *Phusion High–Fidelity* (*Thermo Scientific, EUA*). As condições das reações foram para a desnaturação inicial 98°C por 30 segundos, seguidos de 35 ciclos de 98°C por 10 segundos, anelamento com temperatura de 58°C por 30 segundos e extensão de 72°C por 30 segundos, seguido de extensão final de 72°C por 10 minutos. Como controle negativo da reação foi utilizado um microtubo contendo todos os reagentes exceto o DNAg e como controle positivo foi utilizada a cepa padrão *C. neoformans* (ATCC®90112™). Os produtos das amplificações foram

quantificados e submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) (UltraPure™–Invitrogen) e com o marcador de pares de bases 1 kb DNA *Ladder* (Sinapse Inc, Brasil). Após a visualização das bandas amplificadas, foi realizada a purificação com o Kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) seguido de nova quantificação e novo gel de agarose 1% (p/v) (UltraPure™–Invitrogen) como descrito anteriormente.

As amostras selecionadas foram encaminhadas para o sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano–Setor de Sequenciamento de DNA da Universidade de São Paulo em São Paulo, onde foram analisadas pelo método *Sanger* no aparelho ABI3100 *Fluorescence Automated Sequencer* (Applied Biosystems). Para o sequenciamento do sentido *Forward* (*primer* ITS1) e *Reverse* (*primer* ITS4), foi feito um ajuste entre 25 a 35 ng do produto da PCR de cada isolado clínico a ser sequenciado com a adição de 2,5 µl de cada *primer* (5 pmol).

Os eletroferogramas gerados pelo sequenciamento foram analisados no Programa ChromasPro v.2.1.4 (Technelysium Pty, Ltd). As sequências de nucleotídeos foram comparadas com as sequências depositadas no Banco de Dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool nucleotide* (BLASTn). As identificações das espécies foram baseadas nos critérios: (i) *escore*; (ii) *E-value*; (iii) percentual de identidade entre os isolados clínicos e as referências do NCBI.

4.5.5 - Análise filogenética das sequências ITS das espécies de *Cryptococcus*

A partir do sequenciamento da região ITS do DNAr, foi realizado um alinhamento entre as sequências dos isolados clínicos, as linhagens controle dos tipos moleculares de *C. neoformans* (VNI a VNIV) e *C. gattii* (VGI a VGIV) e controles obtidos do banco de dados GenBank do NCBI. Essa análise foi realizada com intuito de separar as espécies de *Cryptococcus* que não foram possíveis diferenciar pelo sequenciamento. A análise foi realizada no programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) v. 7.0.14, através do método de alinhamento múltiplo com 1000 réplicas. Em seguida, a obtenção do dendrograma (diagrama de árvore) e similaridade genética entre as espécies, foram elaboradas pelo método de *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean* (UPGMA). Todas as posições

contendo deleções ou dados perdidos foram eliminados (TAMURA et al., 2013; KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

4.5.6 - Análise das espécies de *Cryptococcus* por MALDI-TOF MS

Para a confirmação das espécies de alguns isolados clínicos deste trabalho foi realizada o *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS). Para essa técnica, as leveduras foram crescidas em placas de Petri 60 x 15 mm contendo meio de cultura ASD incubadas a 37°C por 48 horas e encaminhadas para empresa Check Up Laboratório de Medicina e Diagnóstico de Uberlândia–MG. A identificação desses isolados clínicos foi realizada no equipamento MALDI Biotyper (BD™ Bruker MALDI Biotyper™), seguindo as instruções do fabricante. O teste foi realizado a partir de culturas em placas em meio de cultura ASD, incubados a 37°C por 48 horas. Após a verificação do crescimento das leveduras nas placas, uma pequena porção da colônia de cada isolado clínico foi transferida para a placa metálica do equipamento MALDI Biotyper. Seguidamente, foi colocada uma gota de matriz polimérica sobre este esfregaço e após a secagem do material, a placa foi introduzida no equipamento MALDI Biotyper. Este esfregaço com a matriz polimérica foi irradiado com um laser onde a amostra foi vaporizada o qual permitiu a ionização de várias moléculas, que foram aspiradas em um tubo de vácuo e imediatamente levadas a um detector. De acordo com a massa de cada molécula, o tempo de chegada ao detector (*Time of Flight*) foi diferente. Este tempo foi inserido no gráfico do *software* do equipamento MALDI Biotyper, gerando vários picos, sendo que para cada espécie fúngica foi gerado um gráfico específico. As interpretações dos resultados encontrados foram analisadas no MALDI Biotyper Database e para a validação dos resultados foram utilizadas linhagens controle de *Cryptococcus* spp.

4.6 – VIRULÊNCIA

Os fatores de virulência avaliados *in vitro* neste trabalho foram a cápsula polissacarídica e a produção de melanina. A pesquisa dos fatores de virulência de *Cryptococcus* spp. foi realizada em duplicata com todos os isolados clínicos estudados neste trabalho. Além disso, foi realizada a infecção experimental *in vivo* no modelo animal alternativo *G. mellonella*. Este ensaio foi realizado para determinar

a virulência das espécies *Cryptococcus* de alguns isolados clínicos que causaram doença em pacientes com o sorotipo HIV negativo e pacientes que não foram possíveis determinar o sorotipo, porém, possivelmente com alguma doença de base que contribuiu para essa infecção. Este experimento foi realizado em duas réplicas biológicas.

4.6.1 - Análise da porcentagem linear da cápsula polissacarídica de *Cryptococcus* spp.

A análise da porcentagem linear da cápsula polissacarídica foi estimada conforme sugerido por Zaragoza, Fries e Casadevall (2003) com algumas modificações. Para isso, todos os isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. foram inoculados em placas de Petri 60 x 15 mm (Olen) contendo meio de cultura ASD e incubados a 37°C por 48 horas. Em seguida, com o auxílio de uma alça bacteriológica uma porção da colônia isolada foi transferida para tubos cônicos de 50 mL contendo 25 mL do meio de cultura YPD (2% (p/v) de glicose [Sigma], 2% (p/v) de peptona [Kasvi] e 1% (p/v) de extrato de levedura [BD]) e incubados por 48 horas a 37°C sob agitação constante de 200 rpm (Shaker Ecotron–Infors HT–Switzerland). Após o crescimento, foi preparada uma suspensão da levedura em solução salina 0,9% estéril, com turbidez equivalente entre 1 a 1,5 da escala de McFarland correspondente a aproximadamente 3×10^8 células mL⁻¹. A suspensão foi homogeneizada e 100 µL desta foi transferida para tubos cônicos de 50 mL contendo 10 mL do meio de cultura líquido RPMI-1640 com MOPS, HCO₃, pH 7,0 que foram colocados dentro de jarras microbiológicas, mantendo a atmosfera em 5% CO₂ e incubados a 37°C por 48 horas.

Após incubação, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm (Eppendorf, Alemanha) por 5 minutos e o sobrenadante foi retirado. Em seguida, 10 µL do sedimento foram pipetados em lâmina 27 x 76 mm (Olen-Microscope), homogeneizados com 10 µL de Tinta da China e coberto com lamínula 18 x 18 mm (Olen-Microscope). As cápsulas foram observadas e fotografadas em microscópio óptico (Zeiss West Germany) com objetiva de 40X. As fotos foram tiradas de vários campos da lâmina para não obter imagens repetidas.

O diâmetro da cápsula polissacarídica de cada isolado clínico foi calculado pela medida do diâmetro da levedura e cápsula (D_{ci}) menos a medida do diâmetro da levedura (D_{cc}) (sem a cápsula). Esses dados foram obtidos utilizando o Programa *Image J* v.1.52a (*National Instituts of Helth*, USA). Posteriormente, uma medida relativa foi calculada representando a porcentagem de cápsula na célula inteira baseada no seguinte cálculo $[(D_{ci}-D_{cc})\times 100]/D_{ci}$. Foram medidas 20 células para cada isolado clínico e a média de cada foi calculada (ZAGAROZA; FRIES; CASADEVALL, 2003). Os dados com o resultado final de cada isolado clínico foram apresentados em forma de porcentagem linear da cápsula polissacarídica.

4.6.2 - Análise da produção de melanina por *Cryptococcus* spp.

A análise da produção de melanina foi realizada conforme Wang e Casadevall (1994) e Pedroso et al. (2010) com algumas modificações. As leveduras de todos os isolados clínicos foram inoculadas em placas de Petri 60 x 15 mm (Olen) contendo meio de cultura ASD e incubadas a 37°C por 48 horas. Em seguida, foi preparada uma suspensão da levedura em solução salina 0,9% esterilizada, com turbidez equivalente entre 1 a 1,5 da escala de McFarland correspondendo a aproximadamente 3×10^8 células mL⁻¹. A suspensão foi homogeneizada em *vortex* (*Mixer-Labnet International*, Inc) e 5 µL desta suspensão foi transferida para placas de Petri 150 x 15 mm (J. Prolab. Ind. Com. Prod. Lab.) contendo o meio de cultura indutor de melanina (1,5% (p/v) ágar [Himedia®], 15 mM glicose [Sigma Aldrich], 10 mM MgSO₄ [Macron™ Chemicals], 29,4 mM KH₂PO₄ [J. T. Baker], 13 mM glicina [Promega], 3,0 µM tiamina [Sigma Aldrich] e 1,0 mM L-dopa [Sigma Aldrich] com pH 5,5). Neste ensaio, como controle positivo do experimento foram utilizadas as linhagens controle *C. neoformans* (ATCC®90112™) e *C. gattii* (ATCC®32269™) e como controle negativo do experimento foi utilizado a linhagem de *Candida parapsilosis* (ATCC®22019™). Posteriormente, as placas de Petri foram incubadas no escuro a 30°C (Biopar Equipamentos Eletro-Eletrônicos, Ltda) por 10 dias.

A produção da melanina foi evidenciada pela coloração das colônias e os critérios de interpretação dos resultados foram: (i) ausência de pigmentação foram classificados com o sinal de menos (-); (ii) pouca intensidade de pigmentação foram classificados com uma cruz (+); (iii) média intensidade de pigmentação foram

classificados com duas cruzes (++); (iv) muita intensidade de pigmentação foram classificados com três cruzes (+++). No último dia do experimento (10º dia) as placas de Petri foram fotografadas para posterior análise dos resultados.

4.6.3 - Análise da virulência de *Cryptococcus* spp. em modelo animal alternativo *Galleria mellonella*

A análise da virulência das espécies de *Cryptococcus* de alguns isolados clínicos deste trabalho foi realizada conforme sugerido por Firacative, Duan e Meyer (2014) e Trevijano-Contador et al. (2015) com algumas modificações. As larvas foram mantidas em nosso laboratório a 28°C no escuro (Eleto Lab®), em recipiente de vidro (30 cm altura x 20 cm largura) com capacidade de 2 L.

Primeiramente, para este ensaio foi realizada uma padronização, onde, foram testados isolados clínicos de diferentes espécies deste trabalho. Além disso, as linhagens controle *C. neoformans* (ATCC®90112™) e *C. gattii* (ATCC®32269™) foram utilizadas como controle do experimento. *Phosphate Buffered Saline* (PBS) foi o controle da inoculação e *naïve* o controle não tratado. Essa padronização foi realizada em três diferentes concentrações (1×10^4 , 1×10^5 e 1×10^6 leveduras/larva) para acompanhar o comportamento das larvas infectadas e padronizar a melhor concentração a ser testada em todos os isolados clínicos que foram selecionados neste experimento.

Os isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. e as linhagens ATCCs (*C. neoformans* e *C. gattii*) foram crescidos em placas de Petri 60 x 15 mm (Acumedia Neogen®, Brasil) contendo meio de cultura ASD e incubados a 37°C (Solab-bacteriológica SL-101) por 48 horas. Em seguida, uma porção da colônia isolada foi transferida com o auxílio de uma alça bacteriológica para tubos cônicos de 50 mL contendo 20 mL do meio de cultura YPD (2% (p/v) de glicose [Sigma], 2% (p/v) de peptona [Kasvi] e 1% (p/v) de extrato de levedura [BD]) incubados a 37°C sob agitação constante de 200 rpm (Shaker Ecotron-Infors HT-Switzerland) por 48 horas. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm (Eppendorf, Alemanha) por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspenso com 1 mL de PBS 1X (NaCl 35 mM [Honeywell/Fluka®], KCL 18 mM [J. T. Baker], Na₂HPO₄ 2,5 mM [Reagen, RJ] e KH₂PO₄ 1,8 mM [J. T. Baker] com pH

7,0). Seguidamente, os tubos cônicos foram homogeneizados em *vortex* (*Mixer-Labnet International*, Inc) e foi realizada uma suspensão em microtubos de 1,5-mL (1:100) com PBS 1X. Dessa suspensão, 5 μ L foi pipetado na câmara de Neubauer (*NewOptics/Improved, Bright-Line*) e com o auxílio de um microscópio óptico (*Oleman*) as células foram contadas e ajustadas.

Para a infecção experimental nas larvas *G. mellonella* foi utilizada uma micro seringa de cromatografia gasosa de volume de 10 μ L (*Hamilton-7000.5KH*). As larvas foram selecionadas no sexto instar do seu desenvolvimento, com tamanhos similares, peso de 200 mg ($\pm$ 50 mg) e ausência de pontos escuros nas cutículas para garantir reprodutibilidade do experimento.

No dia anterior ao experimento as larvas foram separadas em grupos de 10 unidades em placas de Petri de vidro 60 x 15 mm, sendo três placas para cada isolado com as diferentes concentrações testadas, uma placa para PBS 1X (controle da inoculação) e uma placa para o *naïve* (controle não tratado). As larvas foram incubadas no escuro a 37°C por 24 horas com privação de alimentação. Posteriormente, foi injetado em cada larva 5 μ L do inóculo do fungo no centro da ventosa da última pró-pata esquerda da larva. A concentração final do fungo correspondeu a 1×10^4 , 1×10^5 e 1×10^6 leveduras/larva de cada isolado clínico. O mesmo procedimento foi realizado para o controle com apenas o PBS 1X. Entre as infecções, foi realizada uma rigorosa lavagem na micro seringa de Hamilton, seguidas desta ordem: (i) 5 vezes na *Physiological Solution of Insects* (PSI) (30 mM citrato de sódio [Reagen], 150 mM NaCl [Honeywell/Fluka[®]], 10 mM EDTA [Bio Rad], 5 mM KCl [J. T. Baker] e 100 mM Tris [Promega]); (ii) 5 vezes no etanol 70% (Ensure[®]); (iii) 5 vezes em PBS 1X esterilizado.

Após a infecção, as placas com as larvas foram incubadas a 37°C por 13 dias, sendo privadas de ração e iluminação direta durante todo o experimento. No decorrer do experimento e a cada 12 horas as larvas foram retiradas da pré-pupa com intuito de retardar sua metamorfose. A morte das larvas foi considerada quando as mesmas não apresentavam mobilidade ou resposta ao toque. Os dados de morte e vida das larvas foram anotados diariamente até o último dia do experimento.

A concentração padronizada para todo esse experimento foi de 1×10^6 leveduras/larva para cada isolado clínico. Todo o ensaio foi realizado conform descrito acima. Os critérios de interpretação dos resultados foram: (i) isolados clínicos em que até o final do experimento (13º dia) apresentaram larvas vivas foram

considerados pouco virulentos, sendo representados por uma cruz (+); (ii) isolados clínicos em que até o final do experimento (13º dia) todas as larvas morreram foram considerados com virulência intermediária, sendo representados por duas cruces (++); (iii) isolados clínicos em que todas as larvas morreram até o 8º dia do experimento foram considerados muito virulentos, sendo representados por três cruces (+++).

4.7 - DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

A determinação da susceptibilidade aos antifúngicos foi realizada com todos os isolados clínicos *Cryptococcus* spp. O método aplicado foi a técnica de microdiluição em caldo baseado no protocolo M27–A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), utilizando como meio de crescimento para os fungos o *Roswell Park Memorial Institute* Media (RPMI 1640) líquido (Sigma Aldrich®–St. Louis, EUA), com glutamina, acrescido de 0,2% de glicose e tamponado com ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS), pH 7,0 (CLSI, 2008). Os antifúngicos utilizados neste ensaio foram: AMB (Sigma Aldrich®–St. Louis, EUA), FLU (Mapric, Índia), ITR (Fagron, Índia), VOR (Sigma Aldrich®–St. Louis, EUA) e 5-FC (Sigma Aldrich®–St. Louis, EUA). Todo o experimento foi realizado em duplicata.

4.7.1 - Preparo dos antifúngicos

A diluição dos antifúngicos AMB, ITR e VOR, foi preparada com dimetil sulfóxido (DMSO) como solvente de forma que a concentração máxima não ultrapassasse 1%. Para os antifúngicos FLU e 5-FC, o solvente utilizado para diluição foi água esterilizada, conforme protocolo do CLSI.

As soluções estoque dos antifúngicos AMB, ITR e VOR foram preparadas na concentração de $3.200 \mu\text{g mL}^{-1}$, em um volume de 1,0 mL. Foram aliquotadas 0,5 mL em microtubos de 1,5-mL e mantidas em freezer a -80°C , por até 6 meses. Da solução estoque de cada antifúngico descrito acima foram realizadas diluições seriadas no meio de cultura RPMI 1640 líquido e para o experimento foram estabelecidas as concentrações com intervalos de 16 a $0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$, conforme o protocolo do CLSI.

A solução estoque do antifúngico FLU foi preparada na concentração de $12.800 \mu\text{g mL}^{-1}$, em um volume de 1,0 mL. Para a solução estoque da 5-FC, foi preparada na concentração de $8.000 \mu\text{g mL}^{-1}$, em um volume de 1,0 mL. Deste modo, foram aliquotadas 0,5 mL em microtubos de 1,5-mL e mantidas em freezer a -80°C , por até 6 meses. Da solução estoque de cada antifúngico descrito acima foram realizadas diluições seriadas no meio de cultura RPMI 1640 líquido e para o experimento foi estabelecido às concentrações com intervalos de 64 a $0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$, conforme protocolo do CLSI.

4.7.2 - Preparo do inóculo

Para a determinação da susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos, as leveduras foram inoculadas em placa de Petri 60 x 15 mm (Olen) contendo meio de cultura ASD e incubadas a 37°C (Solab–bacteriológica SL–101) por 48 horas. A partir desta cultura, foi preparada a suspensão inicial de leveduras com cinco colônias isoladas com diâmetro de aproximadamente 1 mm coletadas com o auxílio de alça bacteriológica descartável. Essas colônias foram ressuspendidas e homogeneizadas em solução salina 0,9% esterilizada para obter a turvação equivalente entre 0,5 a 0,8 da escala McFarland. A partir da suspensão inicial obteve-se, pela diluição 1:50, uma suspensão parcial de leveduras contendo 1×10^6 a 5×10^6 células mL^{-1} . Dessa suspensão parcial foi realizada uma suspensão final com o meio de cultura líquido RPMI 1640 líquido para uma concentração final de 5×10^2 a $2,5 \times 10^3$ células mL^{-1} . Neste ensaio, como controle positivo do experimento foram utilizadas as linhagens controle *C. neoformans* (ATCC®90112™) e *C. gattii* (ATCC®32269™) e para controle de qualidade do experimento foi utilizado *Candida parapsilosis* (ATCC®22019™).

4.7.3 - Preparo da placa de microdiluição em caldo

Primeiramente foi pipetado 100 μL em cada poço da placa de microdiluição de 96 poços (TPP, Suíça) do meio de cultura RPMI 1640 líquido. Em seguida foram distribuídos 100 μL de cada antifúngico 2X concentrado em cada poço, onde os poços 1-A e 2-A foram respectivamente o controle do antifúngico (maior

concentração) e o controle negativo (esterilidade do meio de cultura) e colunas 11 e 12 (A-H) foram pipetados os controles positivos (crescimento do fungo). As colunas 2 a 10 foram às diluições seriadas (1:2) do antifúngico. Após serem pipetados o antifúngico e os controles, foram pipetados 100 µL nas linhas A, B e C dos inóculos das ATCCs e nas demais linhas foram pipetados os inóculos dos isolados clínicos. Em seguida, as placas de microdiluição de 96 poços foram incubadas a 37°C por 48 horas e posteriormente analisadas.

4.7.4 - Critério de interpretação dos resultados

Após 48 horas de incubação a 37°C, a absorbância de cada poço da placa de microdiluição de 96 poços foi lida no comprimento de onda 492 nm no espectrofotômetro Multiskan (MS). Os valores obtidos com a leitura dos poços testes foram comparados através da média dos valores dos poços controles (isolados) com os controles positivos das ATCCs. A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do antifúngico foi estabelecida de acordo com o documento M27-A3 (CLSI). Para o FLU a menor concentração capaz de inibir o crescimento do fungo é $\geq 50\%$ e para os antifúngicos ITR, VOR, AMB e 5-FC é $\geq 80\%$. Para descartar qualquer presença de contaminação do experimento foi realizada uma análise complementar, na qual foi feita a leitura visual das placas, comparando-se a turvação entre os poços testes e controles.

Os critérios de interpretação dos resultados dos testes de sensibilidade *in vitro* para *Cryptococcus* spp. ainda não são estabelecidos pelo protocolo M27-A3 do CLSI (CLSI, 2008). Devido a isso, considerando que alguns autores têm adaptado os valores propostos para leveduras de *Candida* spp. (BARRY; BROWN, 1996; NGUYEN et al., 1998), os dados obtidos neste trabalho também foram comparados aos dados estabelecidos para as espécies de *Candida*. Os intervalos de concentração dos antifúngicos que determinam a Sensibilidade (S), Sensibilidade Dose Dependente (SDD), Sensibilidade Intermediária (SI) e Resistência (R) de acordo com protocolo M27-A3 do CLSI para *Candida* spp. encontram-se referenciados na Tabela abaixo (Tabela 2).

Tabela 2 – Critérios de interpretação dos resultados dos testes de sensibilidade *in vitro* para espécies de *Candida* ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

Antifúngicos	Sensibilidade	Sensibilidade Dose Dependente	Sensibilidade Intermediária	Resistência
Anfotericina B (AMB)	$\leq 1,000$	-	-	-
Fluconazol (FLU)	$\leq 8,000$	16,000 – 32,000	-	$\geq 64,000$
Itraconazol (ITR)	$\leq 0,125$	0,250 – 0,500	-	$\geq 1,000$
Voriconazol (VOR)	$\leq 1,000$	-	-	-
5-Flucitosina (5-FC)	$\leq 4,000$	-	8,000 – 16,000	$\geq 32,000$

Fonte: Adaptado do CLSI protocolo M27-A3 e M27-S3 (2008).

4.8 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados em geral foram descritos em quantidade (n) e porcentagem (%) e expressos por intermédio de Tabelas e gráficos. Esses procedimentos foram realizados utilizando o programa *Microsoft Excel* 2010 v.14.

As análises dos dados das CIMs e os dados de porcentagem linear da cápsula polissacarídica foram realizadas em dois Grupos distintos: (i) entre as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*; (ii) entre os pacientes sorotipo HIV positivo e negativo. Essas comparações foram avaliadas por meio do Teste de *Mann-Whitney*, onde foram aplicadas com nível de significância de 5% ($P < 0,05$), representados por gráficos (barras de média e desvio padrão). Esses procedimentos foram realizados através do Programa *GraphPad Prism* v.6.0.

As análises dos dados de virulência experimental em modelo animal alternativo (*G. mellonella*) foram realizados apenas para alguns isolados clínicos estudados nesse experimento que apresentaram mais de uma amostra por paciente. Essas comparações foram realizadas por meio do Teste *Log-rank* (Mantel-Cox) com

nível de significância de 5% ($P < 0,05$) e foram representados por gráficos (sobrevivência). Esses procedimentos foram realizados através do Programa *GraphPad Prism* v.5.01.

5 – RESULTADOS

5.1 - ISOLADOS CLÍNICOS DE PACIENTES COM CRIPTOCOCOSE

Nesta pesquisa foram estudados 132 isolados clínicos de espécies do gênero *Cryptococcus* originados de 80 pacientes do HCFMRP-USP com casos clínicos de criptococose. Essa amostragem foi retrospectiva por conveniência entre 19 de novembro de 2012 a 27 de janeiro de 2017. Os isolados clínicos foram coletados de diferentes materiais biológicos, sendo que os materiais que apresentaram maiores porcentagens foram o LCR (n=70; 53%) e o sangue (n=48; 36,3%). O lavado broncoalveolar, a medula óssea, a biopsia de pele, a urina (sonda), o escarro induzido, o escarro espontâneo, a biopsia de gânglio e a ponta de cateter representam cada, entre 0,8 a 1,5% dos isolados clínicos deste trabalho (Tabela 3).

Tabela 3 – Materiais biológicos e os respectivos números de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.

Material biológico	Quantidade de isolados clínicos	
	n	%
Líquido cefalorraquidiano (LCR)	70	53,0
Sangue (SG)	48	36,3
Lavado Broncoalveolar (LBA)	4	3,0
Medula Óssea (MO)	2	1,5
Biopsia de Pele (BP)	2	1,5
Urina (Sonda) (US)	2	1,5
Escarro Induzido (EI)	1	0,8
Escarro Espontâneo (EE)	1	0,8
Biopsia de Gânglio (BG)	1	0,8
Ponta de Cateter (PC)	1	0,8
Total	132	100,0

Fonte: Autoria Própria.

5.2 - DADOS REFERENTE AOS PACIENTES COM CRIPTOCOCOSE

Dos 132 isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. foram diagnosticados 80 pacientes com criptococose, sendo então considerados 1 isolado clínico para cada paciente. As informações de cada paciente (n=80) foram obtidas a partir dos dados contidos nos pedidos de exames micológicos onde ao final deste trabalho foi elaborada uma Tabela contendo os dados de cada paciente (abreviatura do nome dos pacientes, sorotipo HIV positivo, negativo e sorotipo não determinado) com os dados referentes aos isolados clínicos (número de identificação na coleção do LMC-FCFRP, material biológico e data de isolamento da levedura) e todos os resultados obtidos neste trabalho (identificação molecular, susceptibilidade aos antifúngicos e virulência) (Apêndice A).

Os pacientes com criptococose e sorotipo HIV negativo (n=23) foram analisados quanto aos dados clínicos e dados demográficos. Esta escolha foi devido as características clínicas desses pacientes, uma vez que é importante avaliar a existência de doença de base que facilitou a ocorrência da infecção pelo fungo *Cryptococcus* spp. Com o intuito de facilitar a visualização e interpretação dos resultados, foram elaboradas duas Tabelas com os dados dos pacientes sorotipo HIV negativo. Uma Tabela contém os dados clínicos dos pacientes incluindo o número de identificação na coleção do LMC-FCFRP, abreviatura do nome dos pacientes, doenças subjacentes, fatores predisponentes, quadro clínico, evolução da doença, identificação final da espécie e tipos moleculares de cada (Anexo D). A segunda Tabela contém os dados demográficos dos pacientes que incluem o número de identificação na coleção do LMC-FCFRP, abreviatura do nome dos pacientes, idade, gênero, naturalidade e procedência (Anexo E). Os dados referentes aos pacientes HIV positivo (n=52) e os pacientes onde não foi determinada a sorologia para HIV (n=5) não foram incluídos nessas análises.

A maior parte dos pacientes HIV negativo deste trabalho apresentaram doenças subjacentes. De um total de 23 pacientes sorotipo HIV negativo, 7 (18,9%) pacientes apresentavam diabetes mellitus. Os demais apresentavam cardiopatia, distúrbio pulmonar obstrutivo crônico, transplante renal, adenocarcinoma gástrico, adenocarcinoma, artrite reumatoide, cardiopatia valvular, cirrose hepática, displasia pulmonar, doença de Castleman, doença renal crônica, doença renal hipertensiva, encefalopatia hipóxica, esquizofrenia, fibrose pulmonar, hepatopatia, hipotireoidismo,

linfoma não Hodgkin, neoplasia gástrica, obesidade, pneumopatia fibrosante, prematuridade de nascimento, psoríase, tuberculose linfática e dislipidemia. Estes representam cada, entre 2,7 a 5,4% das doenças subjacentes. Ao observar as doenças subjacentes e a possível presença de mais de uma doença no mesmo paciente HIV negativo, foi observado que os pacientes que apresentavam maiores porcentagens destas doenças foram: pacientes com duas doenças (n=9; 39%), uma doença (n=7; 31%) e três doenças subjacentes (n=4; 17%). Apenas 3 (13%) pacientes HIV negativo não apresentavam nenhum tipo de doença subjacente (Tabela 4).

Tabela 4 – Pacientes sorotipo HIV negativo e quantidade de doenças subjacentes.

Nº de doenças subjacentes	Quantidade de pacientes HIV negativo	
	n	%
Duas	9	39
Uma	7	31
Três	4	17
Nenhuma	3	13
Total	23	100

Fonte: Autoria Própria.

Os fatores predisponentes dos pacientes HIV negativo (n=23) também foram observados. Entre eles estão 4 (18%) pacientes que apresentaram insuficiência renal e 3 (13,6%) neutropenia. Os fatores hiperglicemia, imunossupressão, desnutrição, exposição a pombos e outras aves, etilismo, exposição a fezes de pombos, exposição em área rural, drogadição, corticoterapia e cuidadora de aves representam cada, entre 4,5 a 9,1%. Ao observar os fatores predisponentes e a possível presença de mais de um fator no mesmo paciente, foi observado que os pacientes que apresentaram maior quantidade de fatores predisponentes à criptococose foram: pacientes com um fator (n=10; 44%), seguido de nenhum fator (n=7; 30%), dois fatores (n=5; 22%) e três fatores (n=1; 4%) (Tabela 5).

Tabela 5 – Pacientes sorotipo HIV negativo e o número de fatores predisponentes à criptococose.

Nº de fatores predisponentes	Quantidade de pacientes HIV negativos	
	n	%
Um	10	44
Nenhum	7	30
Dois	5	22
Três	1	4
Total	23	100

Fonte: Autoria Própria.

Ao analisar os quadros clínicos e a evolução da criptococose entre os pacientes HIV negativo (n=23) foi observado que os pacientes apresentaram diversos quadro clínicos. Entre eles estão: meningite (n=14; 38%), infecção da corrente sanguínea (n=7; 18%) e pneumonia (n=5; 13%). Infecção urinária, massa pulmonar, pneumopatia cavitária, úlcera cutânea, criptococoma cerebral, linfadenomegalia mediastinal, massa cerebral e pneumopatia nodular representam cada, entre 3 a 5% dos quadros clínicos. Ao observar os quadros clínicos e a possível presença de mais de um quadro no mesmo paciente, foi observado que 10 (43,5%) pacientes apresentaram um e outros 10 (43,5%) pacientes apresentaram dois quadros clínicos. Os eventos de três quadros clínicos, quatro e sem seguimento (sem informação do quadro clínico no prontuário) são representados cada um por 1 (4,3%) paciente sorotipo HIV negativo (Tabela 6). Enquanto que na evolução da criptococose foi observado que a maioria dos pacientes foram a óbito (n=12; 52%), seguido de 7 (31%) pacientes curados da infecção e 4(17%) pacientes que não apresentaram registro de seguimento no prontuário médico consultado, portanto não foi possível determinar a evolução da doença nesses pacientes (Tabela 7).

Tabela 6 – Pacientes sorotipo HIV negativo e o número de quadros clínicos.

Nº de quadros clínicos	Quantidade de pacientes HIV negativos	
	n	%
Um	10	43,5
Dois	10	43,5
Três	1	4,3
Quatro	1	4,3
Sem seguimento	1	4,3
Total	23	100,0

Fonte: Autoria Própria.

Tabela 7 – Pacientes sorotipo HIV negativos e a evolução da criptococose.

Evolução da doença	Quantidade de pacientes HIV negativos	
	n	%
Óbito	12	52
Cura	7	31
Sem seguimento	4	17
Total	23	100

Fonte: Autoria Própria.

Ao analisar as espécies e os tipos moleculares isoladas dos pacientes sorotipo HIV negativo (n=23) foi observado que foram identificados 15 (65%) *C. neoformans*, 7 (31%) *C. gattii* e 1 (4%) *C. laurentii* (Figura 2). Entre os 15 isolados clínicos de *C. neoformans*, 12 (80%) foram do tipo molecular VNI, 1 (7%) VNII e 2 (13%) isolados desta espécie não foi determinado o respectivo tipo molecular (ND) (Figura 3A). Para *C. gattii*, os 7 (100%) isolados clínicos foram identificados com o tipo molecular VGII (Figura 3B). A identificação molecular destes isolados clínicos está descrita em detalhes nos próximos itens desta dissertação.

Figura 2 – Espécies de *Cryptococcus* isoladas dos casos de criptococose dos pacientes sorotipo HIV negativo.

Legenda: Espécies dos isolados clínicos dos pacientes sorotipo HIV negativo: *C. neoformans* (n=15, 65%), *C. gattii* (n=7, 31%) e *C. laurentii* (n=1, 4%). Fonte: Autoria própria.

Figura 3 – Tipos moleculares de *C. neoformans* e *C. gattii* isolados dos pacientes sorotipo HIV negativo com criptococose.

Legenda: Tipos moleculares de *C. neoformans* e *C. gattii*. **A.** *C. neoformans*: VNI (n=12, 80%), VNII (n=1, 7%) e 2 (13%) não determinado (ND); **B.** *C. gattii*: VGII (n=7, 100%). Fonte: Autoria Própria.

Ao analisar a faixa etária e o gênero entre os pacientes HIV negativo (n=23), foi observada a faixa etária entre 0 a 81 anos de idade com média de 52 anos de idade. As faixas etárias que apresentaram maior incidência da criptococose foram: entre 51 e 60 anos (n=7; 31%) e entre 71 e 80 anos (n=5; 22%). As outras faixas etárias representam cada, entre 4 a 13% dos casos de criptococose (Figura 4). Com relação ao gênero dos pacientes, foi observado que a maioria (n=16; 70%) dos

pacientes sorotipo HIV negativo pertencem ao gênero masculino e 7 (30%) pacientes do gênero feminino (Figura 5).

Figura 4 – Faixa etária dos pacientes sorotipo HIV negativo com criptococose.

Legenda: De 0 a 10, de 21 a 30, de 31 a 40 e de 81 a 90 anos representam cada um 1 (4%); de 11 a 20 e de 61 a 70 anos representam cada um 2 (9%); de 41 a 50 anos 3 (13%); de 71 a 80 anos 5 (22%) e de 51 a 60 anos 7 (31%). Fonte: Autoria Própria.

Figura 5 – Gênero dos pacientes sorotipo HIV negativo com criptococose.

Legenda: Quantidade de pacientes do gênero masculino e feminino. Masculino: 16 (70%); feminino 7 (30%). Fonte: Autoria Própria.

Ao analisar a naturalidade dos pacientes HIV negativo (n=23) foi observado que a maioria dos pacientes (n=5; 26%) são naturais da cidade de Ribeirão Preto, seguidos de 2 (10%) pacientes de Ituverava. As cidades Cravinhos, Faxinal, Guara, Ipira, Jales, Jardinópolis, Lunardeli, Ourinhos, Pedregulho, Piritiba, Santa Cruz da Conceição, Santa Teresinha, São José Divino, São Simão, São Tomás Aquino e Virgem da Lapa apresentam 1 paciente (4%) para cada. Enquanto que ao analisar a

procedência desses pacientes foi observado que a maioria dos pacientes (n=7; 31%) são procedentes de Ribeirão Preto. Os pacientes de Barrinha e Jardinópolis são representados por 3 (14%) pacientes para cada, e Brodowski apresentou 2 (9%) pacientes. Ariranha, Guariba, Jaboticabal, Luiz Antônio, Ourinhos, Pirassununga, São Simão e Taquaritinga apresentam 1 (4%) paciente para cada (Anexo E).

5.3 - IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Neste trabalho, um total de 132 linhagens de *Cryptococcus* foram isoladas e identificadas por metodologias clássicas e moleculares. As técnicas moleculares foram utilizadas para possibilitar a identificação das espécies e dos respectivos tipos moleculares de cada isolado clínico. Para isso foi realizada a identificação das espécies (*C. neoformans* e *C. gattii*) por PCR e a identificação dos tipos moleculares *C. neoformans* (VNI – VNIV) e *C. gattii* (VGI – VGIV) por PCR-RFLP. A amplificação da região ITS do DNAr e o sequenciamento foi realizada para 41 linhagens em que a identificação ficou indefinida por PCR e RFLP ou então para a confirmação da identificação de *C. gattii* e *C. laurentii*. Com os resultados do sequenciamento foi elaborado um dendrograma para auxiliar na identificação das espécies. Adicionalmente, para confirmação adicional das espécies de 20 isolados clínicos foi realizado o MALDI-TOF MS (Figura 6).

Figura 6 – Fluxograma das metodologias utilizadas na identificação molecular dos 132 isolados clínicos e o número de isolados clínicos investigados em cada metodologia.

Legenda: A PCR (espécies) e PCR-RFLP (tipos moleculares) foram realizadas para 132 isolados clínicos. A amplificação e sequenciamento da região ITS do DNAr foi realizada para 41 linhagens e através desses resultados foi elaborado um dendrograma. O MALDI-TOF MS foi realizado para 20 isolados clínicos. Fonte: Autoria Própria.

5.3.1 - Determinação das espécies de *Cryptococcus* por PCR

A determinação das espécies de *Cryptococcus* foi realizada por PCR através de pares de *primers* específicos que amplificam fragmentos de DNA no tamanho 695 pb para *C. neoformans* (CNa-70-A/CNa-70-S) e 448 pb para *C. gattii* (CNb-49-A/CNb-49-S). A análise e interpretação dos resultados foram realizadas visualmente pela comparação dos tamanhos em pb das bandas obtidas das linhagens controle.

Ao analisar os resultados foram observados exemplos de isolados clínicos das espécies de *C. neoformans* (Figura 7A) e *C. gattii* (Figura 7B). Dos 132 isolados clínicos analisados, 98 (74%) foram identificados como *C. neoformans* e 13 (10%) como *C. gattii*. Com esta técnica não foi possível determinar a espécie de 21 (16%) isolados clínicos (dados completos no Apêndice A).

Figura 7 – Determinação das espécies *C. neoformans* e *C. gattii* por PCR.

Legenda: **A.** PCR com os *primers* CNa-70-A e CNa-70-S (695 pb) que identifica *C. neoformans*. M, marcador 100 pb DNA Ladder (Sinapse Inc); 1 e 2, exemplos de isolados clínicos; C+, controle positivo (ATCC®90112™ - *C. neoformans*); e C-, controle negativo (sem o DNAg). **B.** PCR com os *primers* CNb-49-A e CNb-49-S (448 pb) que identifica *C. gattii*. M, marcador 100 pb DNA Ladder (Sinapse Inc); 1 e 2 exemplos de isolados clínicos; C+, controle positivo (ATCC®32269™ - *C. gattii*); C-, controle negativo (sem o DNAg). Eletroforese em gel de agarose 2%. Figura representativa da amplificação dos fragmentos de DNA. Fonte: Autoria própria.

5.3.2. - Determinação dos tipos moleculares de *C. neoformans* e *C. gattii* por PCR-RFLP

A determinação dos tipos moleculares de *C. neoformans* e *C. gattii* foi realizada pela amplificação do gene *URA5* e posterior RFLP. A análise e interpretação dos resultados foram realizadas visualmente pela comparação dos perfis de bandas obtidos das linhagens controle, sendo eles *C. neoformans* VNI, VNII, VNIII e VNIV (Figura 8A) e *C. gattii* VGI, VGII, VGIII e VGIV (Figura 8C). Ao analisar os resultados foi observado que, os tipos moleculares encontrados neste estudo foram *C. neoformans* VNI, *C. neoformans* VNII (Figura 8B) e *C. gattii* VGII (Figura 8D). Dos 132 isolados clínicos analisados, 110 (83%) foram identificados

como *C. neoformans*, sendo 104 (95%) do tipo molecular VNI e 6 (5%) VNII. Entre os 15 (12%) isolados clínicos identificados como *C. gattii*, todos foram do tipo molecular VGII. O tipo molecular de 7 (5%) isolados clínicos não foram identificados por este método (dados completos no Apêndice A).

Figura 8 – Determinação dos tipos moleculares de *C. neoformans* e *C. gattii* por PCR-RFLP.

Legenda: **A.** Linhagens controle de *C. neoformans* tipos moleculares VNI a VNIV; coluna 1: M - marcador 100 pb DNA Ladder (Sinapse Inc); colunas 2 - 5 linhagens controle (VNI a VNIV). **B.** Isolados clínicos dos tipos moleculares VNI e VNII. Coluna 1: M - marcador (100 pb); coluna 2: exemplo de isolado clínico VNI; coluna 3: exemplo de isolado clínico VNII e coluna 4: (C-) controle negativo; **C.** Linhagens controle de *C. gattii* tipos moleculares VGI, VGII, VGIII e VGIV; coluna 1: M - marcador (100 pb); colunas 2 - 5: linhagens controle dos tipos moleculares de *C. gattii* (VGI a VGIV); **D.** Isolado clínico tipo molecular VGII; Coluna 1: M - marcador 100 pb DNA Ladder (Sinapse Inc); coluna 2: exemplo isolado clínico VGII e coluna 3: (C-) controle negativo. Eletroforese em Gel de agarose 3%. Figura representativa da restrição enzimática do material amplificado por PCR. Fonte: Autoria própria.

5.3.3 - Determinação das espécies de *Cryptococcus* pela amplificação e sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal

A amplificação e sequenciamento da região ITS do DNAr foi realizada com o intuito de confirmar a espécie de 33 (25%) isolados clínicos deste trabalho. Além disso, as 8 linhagens controle utilizadas para a determinação dos tipos moleculares de *C. neoformans* (VNI - VNIV) e *C. gattii* (VGI – VGIV) também foram incluídas, totalizando (n=41) linhagens. Dos 33 isolados clínicos, 17 (52%) foram identificados como *Cryptococcus* spp., 14 (42%) como *C. gattii* e 2 (6%) como *C. laurentii*. As linhagens controle deste trabalho também foram sequenciadas. Os tipos moleculares *C. neoformans* VNI, VNII, VNIII e VNIV foram identificados como *Cryptococcus* spp. e os tipos moleculares *C. gattii* VGI, VGII, VGIII e VGIV foram identificados como *C. gattii* (Tabela 8).

Tabela 8 – Identificação molecular dos isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. pela amplificação da região ITS do DNAr.

Isolados Clínicos	Escore total	E-value	Identidade (%)	Espécie sugerida	Número de acesso (ID)	Data de Acesso
LMC 6048.01	992	0.0	100%	<i>C. laurentii</i>	FJ545224.1	19/02/2019
LMC 6050.01	773	0.0	100%	<i>Cryptococcus</i> spp.	KY102839.1/KY102667.1	13/02/2019
LMC 6055.01	952	0.0	100%	<i>C. gattii</i>	KY102688.1	11/01/2019
LMC 6057.01	1016	0.0	100%	<i>Cryptococcus</i> spp.	KY102839.1/KY102667.1	11/01/2019
LMC 6058.01	941	0.0	100%	<i>C. gattii</i>	KY102646.1	14/01/2019
LMC 6061.01	1029/1022	0.0	100%	<i>Cryptococcus</i> spp.	KY102839.1/KY102667.1	11/01/2019
LMC 6062.01	1027/1018	0.0	100%	<i>Cryptococcus</i> spp.	KY102839.1/KY102667.1	11/01/2019
LMC 6062.02	898	0.0	100%	<i>Cryptococcus</i> spp.	KY102839.1/KY102667.1	11/01/2019
LMC 6063.01	924	0.0	100%	<i>Cryptococcus</i> spp.	KY102839.1/KY102667.1	11/01/2019
LMC 6064.01	894	0.0	100%	<i>Cryptococcus</i> spp.	KY102839.1/KY102667.1	11/01/2019
LMC 6064.02	979	0.0	100%	<i>Cryptococcus</i> spp.	KY102839.1/KY102667.1	11/01/2019
LMC 6064.03	878	0.0	100%	<i>Cryptococcus</i> spp.	KY102839.1/KY102667.1	11/01/2019
LMC 6074.01	926	0.0	100%	<i>C. gattii</i>	KY102646.1	24/01/2018
LMC 6080.01	917	0.0	100%	<i>Cryptococcus</i> spp.	KY102839.1/KY102667.1	11/01/2019
LMC 6075.01	830	0.0	100%	<i>Cryptococcus</i> spp.	KY102839.1/KY102667.1	11/01/2019
LMC 6075.02	863	0.0	100%	<i>Cryptococcus</i> spp.	KY102839.1/KY102667.1	11/09/2019
LMC 6088.01	833	0.0	100%	<i>C. gattii</i>	KY102646.1	24/01/2018
LMC 6088.02	826	0.0	100%	<i>C. gattii</i>	KY102646.1	24/01/2018
LMC 6096.01	981	0.0	100%	<i>C. gattii</i>	FJ914888.1	19/02/2019
LMC 6098.01	798	0.0	100%	<i>C. gattii</i>	KY102646.1	19/02/2019
LMC 6098.02	728	0.0	100%	<i>C. gattii</i>	KY102646.1	19/02/2019
LMC 6098.03	891	0.0	100%	<i>C. gattii</i>	KY102646.1	19/02/2019

Tabela 8 (continuação) – Identificação molecular dos isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. pela amplificação da região ITS do DNAr.

Isolados Clínicos	Score total	E-value	Identidade (%)	Espécie sugerida	Número de acesso (ID)	Data de Acesso
LMC 6100.01	928/924	0.0	100%	<i>Cryptococcus</i> spp.	KY102839.1/KY102667.1	11/01/2019
LMC 6101.01	813	0.0	100%	<i>Cryptococcus</i> spp.	KY102839.1/KY102667.1	11/01/2019
LMC 6103.01	948	0.0	100%	<i>Cryptococcus</i> spp.	KY102839.1/KY102787.1	11/01/2019
LMC 6103.02	734	0.0	100%	<i>Cryptococcus</i> spp.	KY102839.1/KY102667.1	11/01/2019
LMC 6108.01	933	0.0	100%	<i>C. laurentii</i>	FJ545224.1	19/02/2019
LMC 6110.01	885	0.0	100%	<i>C. gattii</i>	KY102688.1	14/01/2019
LMC 6109.01	944	0.0	100%	<i>Cryptococcus</i> spp.	KY102839.1/KY102667.1	18/01/2019
LMC 6112.01	736	0.0	100%	<i>C. gattii</i>	KY102688.1	11/01/2019
LMC 6116.02	907	0.0	100%	<i>C. gattii</i>	KY102646.1	19/02/2019
LMC 6116.03	885	0.0	100%	<i>C. gattii</i>	KY102646.1	19/02/2019
LMC 6116.04	791	0.0	100%	<i>C. gattii</i>	KY102646.1	19/02/2019
Linhagem Controle <i>C. neoformans</i> (VNI)	907	0.0	100%	<i>Cryptococcus</i> spp.	KY102839.1/KY102667.1	19/02/2019
Linhagem controle <i>C. neoformans</i> (VNII)	983	0.0	100%	<i>Cryptococcus</i> spp.	KY102839.1/KY102667.1	11/01/2019

Tabela 8 (final) – Identificação molecular dos isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. pela amplificação da região ITS do DNAr.

Isolados Clínicos	Escore total	E-value	Identidade (%)	Espécie sugerida	Número de acesso (ID)	Data de Acesso
Linhagem controle <i>C. neoformans</i> (VNIII)	979	0.0	100%	<i>Cryptococcus</i> spp.	KY102909.1/KY102639.1	11/01/2019
Linhagem controle <i>C. neoformans</i> (VNIV)	985	0.0	100%	<i>Cryptococcus</i> spp.	KY102909.1/KY102639.1	11/01/2019
Linhagem controle <i>C. gattii</i> (VGI)	878	0.0	100%	<i>C. gattii</i>	KY102792.1	09/01/2019
Linhagem controle <i>C. gattii</i> (VGII)	979	0.0	100%	<i>C. gattii</i>	KY102688.1	09/01/2019
Linhagem controle <i>C. gattii</i> (VGIII)	881	0.0	100%	<i>C. gattii</i>	FJ914889.1	19/02/2019
Linhagem controle <i>C. gattii</i> (VGIV)	880	0.0	100%	<i>C. gattii</i>	KY102969.1	11/01/2019

Legenda: LMC, Laboratório de Micologia Clínica. Fonte: Dados obtidos no *Genbank* do NCBI.

5.3.4 - Análise filogenética entre as sequências da região ITS do DNAr das espécies de *Cryptococcus*

Com intuito de auxiliar na identificação das espécies pelo sequenciamento da região ITS do DNAr, foram elaboradas duas análises evolutivas através do método UPGMA por alinhamentos múltiplos de sequências de nucleotídeos. A primeira análise foi realizada com todos os 33 isolados clínicos, as 8 linhagens controle (*C. neoformans* VNI a VNIV e *C. gattii* VGI a VGIV) e 16 sequências de linhagens controle do *Centraal Bureau voor Schimmelcultures* (CBS) e ATCCs obtidas do *GenBank* (Figura 9). A segunda análise foi realizada com intuito de melhorar a visualização dos *bootstrap* gerados nos nós do dendrograma. Esta análise foi gerada da mesma forma que a anterior, mas apenas para as espécies de *C. neoformans* e *C. gattii*, sendo 31 isolados clínicos, 8 linhagens controle (*C. neoformans* VNI a VNIV e *C. gattii* VGI a VGIV) e 15 sequências de linhagens controle da CBS e ATCCs obtidas do *GenBank* (Figura 10). Todas as posições contendo lacunas e dados faltantes foram eliminados, havendo um total de 312 posições no conjunto de dados final de cada sequência (Figura 9) e 331 posições no conjunto de dados final de cada sequência (Figura 10). O dendrograma gerado na primeira análise foi separado em três principais subgrupos A, B e C (Figura 9) e o dendrograma gerado na segunda análise foi separado em dois principais subgrupos A e B (Figura 10). Os dados obtidos foram idênticos aos dados citados no primeiro dendrograma gerado (Figura 9), porém foi possível visualizar melhor os resultados obtidos entre *C. neoformans* e *C. gattii* e respectivos valores de *bootstrap* (Figura 10). O subgrupo A apresentou um agrupamento de 25 sequências, sendo 17 isolados clínicos, 2 linhagens controle (*C. neoformans* VNI e VNII), 4 linhagens controle *C. neoformans* (CBS10574, CBS11528, CBS889 e CBS8336) e 2 linhagens controle *C. gattii* (CBS1934 e CBS12278). Apesar da maioria das sequências das linhagens controle serem de *C. neoformans*, este subgrupo é heterogêneo e apresentou duas linhagens controle *C. gattii* (CBS1934 e CBS12278), por isso, não é possível afirmar que todos os isolados clínicos agrupados no subgrupo A sejam *C. neoformans*. Mesmo assim, sugere-se que 16 (94%) isolados clínicos sejam *C. neoformans*, com exceção do isolado LMC 6080.01 que provavelmente é *C. gattii*,

pois pelas metodologias PCR e PCR-RFLP foi identificado como *C. gattii* VGII. No subgrupo B, o agrupamento foi formado por 20 sequências, sendo 14 isolados clínicos, 1 linhagem controle *C. gattii* VGII e 5 linhagens controle *C. gattii* (CBS10865, CBS11240, CBS10089, CBS11537 e ATCC®MYA4561™). As sequências agrupadas apresentaram alguns polimorfismos que as diferenciaram das sequências agrupadas no subgrupo A. Todas as linhagens controle agrupadas no subgrupo B são *C. gattii* e, portanto é possível afirmar que os isolados clínicos agrupados neste subgrupo são *C. gattii*. Já o subgrupo C foi formado por 3 sequências, sendo 2 isolados clínicos e 1 linhagem controle *C. laurentii* (ATCC®MYA-2946™). Este agrupamento está distante dos demais agrupamentos deste dendrograma (Figura 9). Além dos subgrupos principais das duas análises foram observados outros agrupamentos (Figura 9 e 10). As linhagens controle *C. neoformans* VNIII e VNIV ficaram agrupados com 1 linhagem controle *C. neoformans* (CBS5728). As linhagens controle *C. gattii* VGI e VGIV ficaram agrupadas com 2 linhagens controle *C. gattii* (CBS8743 e CBS11249). A linhagem controle *C. gattii* VGIII ficou agrupada com 1 linhagem controle *C. gattii* (ATCC®MYA4562™). Os valores de *bootstrap* gerados estão indicados nos nós do dendrograma (Figuras 9 e 10).

Figura 9 – Análise filogenética referente às relações evolutivas entre as espécies de *Cryptococcus*.

Legenda: Dendrograma gerado a partir das sequências de DNA da região ITS do DNAr. *, Linhagens controle dos tipos moleculares de *C. neoformans* (VNI – VNIV) e *C. gattii* (VGI – VGIV). A análise envolveu 57 sequências de nucleotídeos, com um total de 312 posições no conjunto de dados final. Todas as posições contendo lacunas e dados faltantes foram eliminadas. **A.** Isolados clínicos de *C. neoformans*; **B.** Isolados clínicos de *C. gattii*; **C.** Isolados clínicos de *C. laurentii*. Nos nós do dendrograma estão indicados os valores de *bootstrap*. Dados obtidos no programa MEGA 7 pelo método UPGMA. Fonte: Autoria própria.

Figura 10 – Análise filogenética referente às relações evolutivas entre as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*.

Legenda: Dendrograma gerado a partir das sequências de DNA da região ITS do DNAr. *, Linhagens controle dos tipos moleculares de *C. neoformans* (VNI – VNIV) e *C. gattii* (VGI – VGIV). A análise envolveu 54 sequências de nucleotídeos, com um total de 331 posições no conjunto de dados final. Todas as posições contendo lacunas e dados faltantes foram eliminadas. **A.** Isolados clínicos de *C. neoformans*; **B.** Isolados clínicos de *C. gattii*. Nos nós do dendrograma estão indicados os valores de *bootstrap*. Dados obtidos no programa MEGA 7 pelo método UPGMA. Fonte: Autoria própria.

5.3.5 - Análise das espécies de *Cryptococcus* por MALDI-TOF MS

A análise por MALDI-TOF MS foi realizada para auxiliar na confirmação da espécie de 20 isolados clínicos deste trabalho. A análise dos espectros gerados mostrou que 15 (75%) isolados clínicos foram identificados como *C. neoformans*, 3 (15%) como *C. laurentii* e 2 (10%) como *C. gattii* (Tabela 9). Para cada isolado clínico foi gerado um espectro que foram agrupados para *C. neoformans* (Figura 11), *C. laurentii* (Figura 12) e *C. gattii* (Figura 13).

Tabela 9 – Identificação dos isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. por MALDI-TOF MS.

Isolados clínicos	Identificação por MALDI-TOF MS
LMC 6050.01	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LMC 6057.01	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LMC 6062.01	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LMC 6062.02	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LMC 6063.01	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LMC 6064.01	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LMC 6064.02	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LMC 6064.03	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LMC 6075.01	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LMC 6075.02	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LMC 6100.01	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LMC 6101.02	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LMC 6103.01	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LMC 6103.02	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LMC 6109.01	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LMC 6048.01	<i>C. laurentii</i>
LMC 6048.02	<i>C. laurentii</i>
LMC 6108.01	<i>C. laurentii</i>
LMC 6080.01	<i>C. gattii</i>
LMC 6096.01	<i>C. gattii</i>

Legenda: LMC, Laboratório de Micologia Clínica. Fonte: Autoria Própria.

Figura 11 – Espectros gerados na identificação dos isolados clínicos de *C. neoformans* por MALDI-TOF MS. Intensity (eixo y), intensidade relativa; m/z (eixo x), razão massa sobre a carga.

Fonte: Dados obtidos do MALDI-TOF MS.

Figura 12 – Espectros gerados na identificação dos isolados clínicos de *C. laurentii* por MARLDI-TOF MS. Intensity (eixo y), intensidade relativa; m/z (eixo x), razão massa sobre a carga.

Fonte: Dados obtidos do MALDI-TOF MS.

Figura 13 – Espectros gerados na identificação dos isolados clínicos de *C. gattii* por MARLDI-TOF MS. Intensity (eixo y), intensidade relativa; m/z (eixo x), razão massa sobre a carga.

Fonte: Dados obtidos do MALDI-TOF MS.

5.3.6 - Identificação molecular final dos isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.

A partir dos resultados obtidos na identificação molecular por PCR, PCR-RFLP, amplificação e sequenciamento da região ITS do DNAr, dendrograma e MALDI-TOF MS, foi possível determinar as espécies dos 132 (100%) isolados

clínicos e o tipo molecular de 126 (95%) isolados clínicos (Figura 14 e Apêndice A). Assim, foram identificados 113 (86%) *C. neoformans*, 16 (12%) *C. gattii* e 3 (2%) *C. laurentii* (Figura 14A). Entre os *C. neoformans* identificados, 105 (93%) são do tipo molecular VNI, 6 (5%) VNII e para 2 (2%) isolados clínicos não foi possível determinar o tipo molecular (ND). Para *C. gattii*, 15 (94%) isolados clínicos são do tipo molecular VGII e apenas 1 (6%) isolado clínico não foi possível determinar o tipo molecular (ND) (Figura 14B).

Figura 14 – Identificação molecular final das espécies de *Cryptococcus* e seus respectivos tipos moleculares.

Legenda: **A.** Espécies encontradas no trabalho: 113 (86%) isolados clínicos *C. neoformans*, 16 (12%) *C. gattii* e 3 (2%) *C. laurentii*; **B.** Tipos moleculares encontrados das espécies de *C. neoformans* e *C. gattii*: *C. neoformans*: 105 (93%) isolados clínicos do tipo molecular VNI, 6 (5%) VNII e 2 (2%) isolados clínicos que não foi possível determinar o tipo molecular (ND); *C. gattii* 16 (12%) isolados clínicos, 15 (94%) isolados clínicos do tipo molecular VGII e 1 (6%) isolado clínico que não foi possível determinar o tipo molecular (ND). Fonte: Autoria Própria.

5.4 – VIRULÊNCIA

Os fatores de virulência *in vitro* avaliados foram a cápsula polissacarídica e a produção de melanina. Os dados foram avaliados de três maneiras distintas: (i) análise geral dos fatores de virulência dos 132 isolados clínicos deste estudo e um isolado clínico de cada um dos 80 casos clínicos (sorotipo HIV positivo (n=52), sorotipo HIV negativo (n=23) e sorotipo HIV não determinado (n=5)) deste trabalho; (ii) comparação entre as espécies *C. neoformans* (n=113), *C. gattii* (n=16) e *C. laurentii* (n=3); (iii) comparação dos isolados clínicos de pacientes sorotipo HIV positivo (n=52) e sorotipo HIV negativo (n=23), sendo que nesta análise (n=5) pacientes sorotipo HIV não determinados não foram incluídos nesta análise. Na análise dos 80 pacientes diagnosticados com criptococose, foi considerado apenas 1 isolado clínico para cada paciente. Foram utilizados dois critérios para este fim: (i) prioridade para a primeira amostra do paciente; (ii) sendo datas idênticas, prioridade ao material biológico LCR (Apêndice A).

A virulência de 33 isolados clínicos das diferentes espécies obtidas no trabalho (*C. neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii*) foi avaliada em modelo animal alternativo *G. mellonella*. Os isolados clínicos selecionados para este ensaio foram aqueles que causaram doença em pacientes sorotipo HIV negativo e em pacientes que não foi possível determinar o sorotipo HIV, porém, possivelmente com alguma doença de base que contribuiu para a infecção com criptococose. Os dados foram avaliados de três maneiras distintas: (i) análise geral dos 33 isolados clínicos; (ii) análise entre a virulência dos isolados clínicos da mesma espécie, sendo *C. neoformans* (n=20), *C. gattii* (n=11) e *C. laurentii* (n=2); (iii) análise comparando a virulência de dois isolados clínicos do mesmo paciente, sendo que 5 pacientes com criptococose foram avaliados. A análise entre os casos clínicos foi realizada com intuito de observar se houve diferença na curva de sobrevivência das larvas infectadas pelos isolados clínicos do mesmo paciente.

5.4.1 - Análise da porcentagem linear da cápsula polissacarídica de *Cryptococcus* spp.

Na análise geral da porcentagem linear da cápsula polissacarídica dos 132 (100%) isolados clínicos, foi possível visualizar e medir a cápsula polissacarídica de 129 (98%) isolados clínicos que apresentaram uma média de porcentagem linear de cápsula de 55,66% ($\pm 5,72$). Dos 129 isolados clínicos que produziram cápsula, 113 são *C. neoformans* e 16 *C. gattii*. Os 3 isolados clínicos que não produziram cápsula nas condições testadas no experimento foram *C. laurentii* (Figura 15). As médias das porcentagens lineares das cápsulas entre os isolados clínicos *C. neoformans* e os isolados clínicos *C. gattii* foram de 55,49% ($\pm 5,40$) e 56,88% ($\pm 7,50$), respectivamente. Quando analisada a diferença estatística entre esses isolados clínicos, não foi observada diferença estatística entre eles ($P=0,3648$) (Figura 16).

A análise geral da porcentagem linear da cápsula polissacarídica dos 75 (100%) isolados clínicos oriundos dos 52 pacientes sorotipos HIV positivo e 23 pacientes sorotipo HIV negativo apresentou a média geral de 54,68% ($\pm 8,67\%$). Ao comparar a porcentagem linear da cápsula entre os isolados clínicos oriundos de pacientes sorotipo HIV positivo ($n=52$) e pacientes sorotipo HIV negativo ($n=23$), foi observado que as médias foram 56,70% ($\pm 5,30$) e 53,90% ($\pm 12,94$), respectivamente. Sendo que nesta análise os isolados clínicos oriundos desses pacientes apresentarem valores com muita variância entre eles. Quando analisado a diferença estatística entre esses isolados clínicos, foi observado que houve diferença estatística entre eles ($P=0,0380$). Esta diferença é devido a 1 isolado clínico oriundo de paciente sorotipo HIV negativo que não apresentou produção de cápsula polissacarídica (LMC 6048.01 - *C. laurentii*) (Figura 17).

Figura 15 – Cápsula polissacarídica de leveduras de *C. neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii*.

Legenda: Coloração de leveduras de *C. neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii* com tinta da China. **A.** ATCC®90112™ *C. neoformans*. **B.** ATCC®32269™ *C. gattii*. **C.** Exemplo de isolado clínico *C. neoformans*. **D.** Exemplo de isolado clínico *C. gattii*. **E.** Exemplo de isolado clínico *C. laurentii*. Microscopia de campo claro (objetiva de 40x). Barra de escala: 50 µm. Fonte: Autoria Própria.

Figura 16 – Análise estatística da produção de cápsula polissacarídica entre os isolados clínicos *C. neoformans* (n=113) e *C. gattii* (n=16).

Legenda: As barras indicam a média e desvio padrão. O *value P* foi realizado com nível de significância de 5% ($P < 0,05$) pelo teste *Mann-Whitney*. Dados obtidos através do Programa *GraphPad Prism* v.6.0. Fonte: Autoria Própria.

Figura 17 – Análise estatística da produção de cápsula polissacarídica entre os isolados clínicos de pacientes sorotipo HIV positivo (n=52) e pacientes sorotipo HIV negativo (n=23).

Legenda: As barras indicam a média e desvio padrão. O *value P* foi realizado com nível de significância de 5% ($P < 0,05$) pelo teste *Mann-Whitney*. Dados obtidos através do Programa *GraphPad Prism* v.6.0. Fonte: Autoria Própria.

5.4.2 - Análise da produção de melanina por *Cryptococcus* spp.

A análise geral da produção de melanina dos 132 (100%) isolados clínicos revelou que todos foram produtores de melanina, mas com alteração na intensidade de produção. Entre todos os isolados clínicos, 81 (61%) apresentaram colônias com alta intensidade de produção de melanina, 43 (33%) com média intensidade e 8 (6%) com baixa intensidade. As linhagens controle *C. neoformans* (ATCC®90112™) e *C. gattii* (ATCC®32269™) apresentaram média e baixa intensidade de produção de melanina, respectivamente. A linhagem utilizada como controle negativo, *Candida parapsilosis* (ATCC®22019™), apresentou ausência de produção de melanina. O padrão de coloração avaliado está representado na Figura 18. Entre os 113 isolados clínicos de *C. neoformans* foi observado que a produção de melanina foi heterogênea, sendo que 72 (64%) apresentaram colônias com alta produção, 36 (32%) apresentaram colônias com média produção e 5 (4%) apresentaram colônias com baixa produção de melanina. Dos 16 isolados clínicos de *C. gattii*, 9 (56%) apresentaram colônias com alta produção e 7 (44%) apresentaram colônias com média produção de melanina. Todos *C. laurentii* 3 (100%) aqui estudados apresentaram colônias com baixa produção de melanina (Tabela 10).

Ao analisar a produção de melanina entre os isolados clínicos provenientes dos 80 pacientes diagnosticados com criptococose, foi observado que 51 (64%) isolados clínicos apresentaram colônias com alta produção, 22 (27%) com média produção e 7 (9%) com baixa produção de melanina. Considerando somente os isolados clínicos oriundos de pacientes sorotipo HIV positivo, 50 (96%) isolados clínicos são *C. neoformans* e entre estes 31 (62%) apresentaram colônias com alta produção, 14 (28%) apresentaram colônias com média produção e 5 (10%) apresentaram colônias com baixa produção de melanina. Entre os isolados clínicos *C. gattii* de pacientes sorotipo HIV positivo, 1 apresentou colônia com alta produção e outro com média produção de melanina. Já entre todos os isolados clínicos oriundos de pacientes sorotipo HIV negativo, 15 (65%) isolados clínicos são *C. neoformans* onde 11 (73%) apresentaram colônias com alta produção e 4 (27%) apresentaram colônias com média produção de melanina. Para os 7 isolados clínicos *C. gattii* oriundos de pacientes sorotipo HIV negativo, 4 (57%) apresentaram colônias com alta produção e 3 (43%) apresentaram colônias com média produção

de melanina. Já o único isolado clínico identificado como *C. laurentii*, (100%) apresentou colônia com baixa produção de melanina. Este trabalho teve 5 isolados clínicos oriundos de pacientes sorotipo HIV não determinado e entre eles foram identificados 3 (60%) *C. neoformans* e 1 (20%) *C. gattii* onde ambos apresentaram colônias com alta produção de melanina. O único isolado clínico oriundo de pacientes sorotipo HIV não determinado que foi identificado como *C. laurentii* apresentou colônia com baixa produção de melanina (Tabela 11).

Figura 18 – Padrão de produção de melanina por leveduras em meio de cultura L-Dopa.

Legenda: Colônias de *Cryptococcus* sp. em meio de cultivo L-dopa incubado a 37°C por 10 dias. **A.** colônia com alta produção de melanina. **B.** colônia com média produção de melanina. **C.** colônia com baixa produção de melanina. **D.** colônia com ausência de produção de melanina (*Candida parapsilosis* ATCC®22019™). Fonte: Autoria Própria.

Tabela 10 – As espécies de *Cryptococcus* e produção de melanina.

Espécie	+	++	+++	Total
<i>C. neoformans</i>	4 % (n=5)	32% (n=36)	64% (n=72)	100% (n=113)
<i>C. gattii</i>	0	44% (n=7)	56% (n=9)	100% (n=16)
<i>C. laurentii</i>	100% (n=3)	0	0	100% (n=3)
Total de isolados clínicos	n=8	n=43	n=81	n=132

Legenda: +, baixa produção de melanina; ++, média produção de melanina; +++, alta produção de melanina; n, número de isolados clínicos. Fonte: Autoria Própria.

Tabela 11 – Relação do número de isolados clínicos com a intensidade de produção de melanina dos isolados clínicos oriundos de pacientes sorotipos HIV positivo, HIV negativo e HIV não determinado entre as espécies isoladas de *Cryptococcus*.

Sorotipos Critérios/Espécies	HIV positivo (n=52)		HIV negativo (n=23)			Não Determinado (n=5)		
	<i>C. neoformans</i> (n=50)	<i>C. gattii</i> (n=2)	<i>C. neoformans</i> (n=15)	<i>C. gattii</i> (n=7)	<i>C. laurentii</i> (n=1)	<i>C. neoformans</i> (n=3)	<i>C. gattii</i> (n=1)	<i>C. laurentii</i> (n=1)
+	5	0	0	0	1	0	0	1
++	14	1	4	3	0	0	0	0
+++	31	1	11	4	0	3	1	0

Legenda: +, baixa produção de melanina; ++, média produção de melanina; +++, alta produção de melanina; n, número de isolados clínicos. Fonte: Autoria Própria.

5.4.3 - Análise da virulência de *Cryptococcus* spp. em modelo animal alternativo *Galleria mellonella*

A análise da virulência de espécies de *Cryptococcus* em *G. mellonella* foi inicialmente determinada pela determinação da melhor concentração do inóculo de leveduras capaz de causar virulência intermediária em larvas de *G. mellonella*. Assim, a determinação desta concentração foi realizada com *C. neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii* e nas concentrações 1×10^4 , 1×10^5 e 1×10^6 leveduras/larva. Como controle do experimento foram utilizadas as linhagens *C. neoformans* (ATCC®90112™) e *C. gattii* (ATCC®32269™), além das condições PBS 1X (controle da inoculação) e *naïve* (controle não tratado). Foi observado que nas concentrações de 1×10^4 e 1×10^5 leveduras/larva houve a sobrevivência da maioria das larvas infectadas até o final do experimento (13º dia) quando infectadas com *C. gattii* (ATCC®32269™), LMC 6046.01 (*C. neoformans*), LMC 6055.01 (*C. gattii*) e LMC 6048.02 (*C. laurentii*). A linhagem controle *C. neoformans* (ATCC®90112™), para essas duas concentrações de leveduras inoculadas, causou a morte das larvas no 7º e 8º dia, respectivamente. A concentração das leveduras que foi capaz de matar a maioria das larvas infectadas foi 1×10^6 leveduras/larvas. Nesta, foi observada a morte das larvas no 5º, 8º, 8º e 10º dia do experimento para *C. neoformans* (ATCC®90112™), LMC 6046.01 (*C. neoformans*), LMC 6048.02 (*C. laurentii*) e *C. gattii* (ATCC®32269™), respectivamente. Além disso, nessa mesma concentração foi observada a sobrevivência de larvas até o final do experimento (13º dia) apenas para a linhagem LMC 6055.01 (*C. gattii*). Desta maneira, a concentração de 1×10^6 leveduras/larvas foi a que mostrou maior eficiência de virulência ao longo dos 13 dias de experimento (Figura 19).

Figura 19 – Sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com isolados clínicos e linhagens controle de *Cryptococcus* spp. em diferentes concentrações de inóculo de levedura.

Legenda: Padronização do experimento *in vivo* em *G. mellonella*. Linhagens controle: ATCC®90112™ (*C. neoformans*); ATCC®32269™ (*C. gattii*); LMC 6046.01, isolado clínico *C. neoformans*; LMC 6055.01 isolado clínico *C. gattii*; LMC 6048.01 isolado clínico *C. laurentii*. Dados obtidos através do Programa *GraphPad Prism* v.5.01. Fonte: Autoria Própria.

Os isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. escolhidos para o teste de virulência foram selecionados entre os pacientes HIV negativo e os pacientes de sorologia HIV não determinada. Os dados foram avaliados de três maneiras distintas: (i) análise geral dos 33 isolados clínicos (*Cryptococcus* spp.); (ii) análise entre a virulência dos isolados clínicos da mesma espécie, sendo *C. neoformans* (n=20; 61%), *C. gattii* (n=11; 33%) e *C. laurentii* (n=2; 6%) (Apêndice A); (iii) análise comparando a virulência de dois isolados clínicos do mesmo paciente, sendo que 5 pacientes com criptococose foram avaliados. A análise entre os casos clínicos foi realizada com intuito de observar se houve diferença na curva de sobrevivência das larvas infectadas pelos isolados clínicos do mesmo paciente. Ao analisar os resultados de virulência de todos os 33 (100%) isolados clínicos, foi observado que 15 (46%) foram muito virulentos (+++), pois houve a morte de todas as larvas até o 8º dia do experimento; 10 (30%) foram considerados com virulência intermediária (++), pois houve a morte de todas as larvas até o último dia do experimento (13º dia); e 8 (24%) foram pouco virulentos (+), pois até o final do experimento tiveram larvas vivas. Dos 20 isolados clínicos *C. neoformans*, 10 (50%) foram considerados muito virulentos (Figura 20A), 3 (15%) foram considerados com virulência intermediária (Figura 20B) e 7 (35%) pouco virulentos (Figura 20C). A linhagem controle *C. neoformans* (ATCC®90112™) apresentou pouca virulência. Dentre os 11 isolados clínicos *C. gattii*, 5 (45,5%) foram considerados muito virulentos (Figura 20D), 5 (45,5%) com virulência intermediária (Figura 20E) e 1 (9%) foi considerado pouco virulento (Figura 20F). A linhagem controle *C. gattii* (ATCC®32269™) apresentou pouca virulência. Já considerando os 2 isolados clínicos de *C. laurentii*, foi observado que os 2 isolados clínicos apresentaram virulência intermediária (Figura 20G).

Figura 20 – Curva de sobrevivência em *G. mellonella* infectadas com isolados clínicos de *C. neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii*.

Legenda: Isolados clínicos *C. neoformans*: **A. +++**, muito virulentos; **B. ++**, virulência intermediária; **C. +**, pouco virulentos; Isolados clínicos *C. gattii*: **D. +++**, muito virulentos; **E. ++**, virulência intermediária; **F. +**, pouco virulentos; **G.** Isolados clínicos *C. laurentii*: **G. ++**, virulência intermediária. Dados obtidos através do Programa *GraphPad Prism* v.5.01. Fonte: Autoria Própria.

Ao analisar os 33 isolados clínicos foram observados que estes isolados clínicos compreendem 23 casos clínicos de pacientes com criptococose. Dos 23 casos clínicos, 18 (78%) isolados clínicos são de pacientes sorotipo HIV negativo e 5 (22%) são de pacientes sorotipo HIV não determinado. Para 5 pacientes sorotipo HIV negativo foram analisados 2 isolados clínicos de cada, sendo que para cada paciente foi isolado uma única espécie e tipo molecular. Entre os isolados clínicos estão 6 *C. gattii* VGII oriundos de 3 pacientes e 4 isolados clínicos *C. neoformans* VNI oriundos de 2 pacientes. Foi observado que entre os isolados clínicos do mesmo paciente todos apresentaram os tipos de virulência muito virulentos (+++) e virulência intermediária (++) . Com o intuito de comparar a virulência dos isolados clínicos identificados do mesmo paciente foi realizado uma análise estatística comparando a curva de sobrevivência entre cada um desses isolados clínicos. Ao realizar a análise estatística comparando os isolados clínicos *C. gattii* dos pacientes J. A. S. B. (LMC 6088.01 e LMC 6088.02), L. S. (LMC 6098.01 e LMC 6098.03) e N. P. O. (LMC 6116.03 e LMC 6116.04), foram observados os valores $P=0,6761$, $P=0,5141$ e $P=0,5742$, respectivamente. Desta maneira, não houveram diferenças estatísticas e, portanto, os isolados clínicos do mesmo paciente apresentam semelhantes curvas de sobrevivência entre eles. A virulência dos isolados clínicos *C. gattii* do mesmo paciente foram considerados como muito virulentos (Figura 21A) e com virulência intermediária (Figura 21B e 21C), respectivamente. Já na análise estatística comparando os isolados clínicos *C. neoformans* dos pacientes J. M. B. (LMC 6068.01 e LMC 6068.02) e J. M. S. (LMC 6091.01 e LMC 6091.02) foram observados os valores $P=0,0382$ e $P=0,0130$, respectivamente. Desta maneira, houve diferenças estatísticas entre os perfis de virulência desses isolados clínicos e, portanto, apresentaram diferenças na curva de sobrevivência dos isolados clínicos do mesmo paciente. A virulência que esses isolados clínicos apresentaram foram virulência intermediária (Figura 21D) e muito virulentos (Figura 21E), respectivamente.

Figura 21 – Análise estatística comparando a curva de sobrevivência em *G. mellonella* infectadas com isolados clínicos de *C. gattii* e *C. neoformans* do mesmo paciente.

Legenda: Análise estatística comparando os isolados clínicos do mesmo paciente. Isolados clínicos *C. gattii*: **A.** LMC 6088.01 e LMC 6088.02 – muito virulentos (+++); **B.** LMC 6098.01 e LMC 6098.03 – virulência intermediária (++); **C.** LMC 6116.03 e LMC 6116.04 – virulência intermediária (++); Isolados clínicos *C. neoformans*: **D.** LMC 6068.01 e LMC 6068.02 – virulência intermediária (++); **E.** LMC 6091.01 e LMC 6091.02 – muito virulentos (+++). Os *value P* foi realizado com nível de significância de 5% ($P<0,05$) pelo teste *Log-rank*. Gráficos e análises estatísticas obtidos através do Programa *GraphPad Prism v.5.01*. Fonte: Autoria própria.

5.5 - SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

As CIMs dos antifúngicos AMB, FLU, ITR, VOR e 5-FC foram determinadas para os 132 isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. pelo método de microdiluição em caldo seguindo o protocolo M27-A3 do CLSI. Os dados foram avaliados de três maneiras distintas: (i) análise geral: foi analisada a susceptibilidade aos antifúngicos de todos os 132 isolados clínicos e dos 80 casos clínicos (sorotipo HIV positivo, sorotipo HIV negativo e sorotipo HIV não determinado) conforme os critérios descritos no subitem (5.4); (ii) comparação entre as espécies *C. neoformans* (n=113), *C. gattii* (n=16) e *C. laurentii* (n=3); (iii) comparação dos isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. de pacientes sorotipo HIV positivo (n=52) e sorotipo HIV negativo (n=23), sendo que nesta análise os 5 casos clínicos sorotipo HIV não determinado não foram incluídos. A análise de isolados clínicos do mesmo paciente foi realizada com o intuito de observar as diferenças entre a susceptibilidade aos antifúngicos.

5.5.1 - Análise geral da susceptibilidade aos antifúngicos

Em geral, ao analisar a susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos dos 132 (100%) isolados clínicos foi observado que todos foram sensíveis a AMB e VOR, ambos com intervalo de CIM entre (0,031 a 1,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Tabela 2 e Apêndice A). Para ITR, FLU e 5-FC, a maioria foi sensível, embora alguns isolados clínicos tenham apresentado sensibilidade dose dependente (SDD) e resistência. Entre eles, 16 (12%) isolados clínicos apresentaram SDD para ITR (CIM 0,250 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 3 (2%) SDD para FLU (CIM 16,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e 3 (2%) apresentaram resistência a 5-FC (CIM 64,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Já na análise da susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos das 80 linhagens (100%) isoladas dos 80 pacientes com caso de criptococose mostrou que 14 (18%) isolados clínicos apresentaram SDD e resistência aos antifúngicos ITR, FLU e 5-FC. Entre eles, 9 apresentaram SDD ao ITR, 3 apresentaram SDD ao FLU e 2 apresentaram resistência a 5-FC (Tabela 2 e 12).

Tabela 12 – Isolados clínicos que apresentaram Sensibilidade Dose Dependente e Resistência aos antifúngicos ITR, FLU e 5-FC e ATCCs utilizadas como controle do experimento.

Isolado Clínico (n=21)	Paciente	Sorotipo	Identificação Molecular Final	Determinação da susceptibilidade aos antifúngicos ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				
				AMB	FLU	ITR	VOR	5-FC
LMC 6043.01	E. G. S.	HIV+	<i>C. neoformans</i> (VNI)	0,500	16,000*	0,031	0,250	1,000
LMC 6048.01	RN A. A. F.	HIV-	<i>C. laurentii</i>	0,125	2,000	0,125	0,500	64,000**
LMC 6048.02			<i>C. laurentii</i>	0,125	4,000	0,250*	0,500	64,000**
LMC 6074.01	S. C. S. S.	ND	<i>C. gattii</i> (VGII)	0,062	16,000*	0,125	0,250	1,000
LMC 6080.01	A. R.	HIV-	<i>C. gattii</i> (VGII)	0,062	4,000	0,250*	1,000	2,000
LMC 6086.01	A. F. B.	HIV+	<i>C. neoformans</i> (VNI)	0,125	0,250	0,250*	0,031	4,000
LMC 6087.03	J. S. S.	HIV+	<i>C. neoformans</i> (VNI)	0,125	4,000	0,250*	0,031	0,500
LMC 6088.02	J. A. S. B.	HIV-	<i>C. gattii</i> (VGII)	0,031	4,000	0,250*	1,000	0,500
LMC 6095.01	O. B.	HIV-	<i>C. neoformans</i> (VNI)	0,062	0,500	0,250*	0,125	0,500
LMC 6096.01	C. L. T.	HIV+	<i>C. gattii</i> (VGII)	0,125	16,000*	0,125	0,125	0,500
LMC 6097.01	A. N. S.	HIV+	<i>C. neoformans</i> (VNI)	0,125	8,000	0,250*	0,125	1,000
LCM 6105.02	R. S. B.	HIV+	<i>C. neoformans</i> (VNI)	0,062	0,500	0,250*	0,500	1,000
LCM 6106.02	G. J. S.	HIV+	<i>C. neoformans</i> (VNI)	0,062	4,000	0,250*	0,500	0,125
LCM 6108.01	M. C.	ND	<i>C. laurentii</i>	0,500	4,000	0,125	0,125	64,000**
LCM 6110.01	M. N. P. P.	HIV-	<i>C. gattii</i> (VGII)	0,250	4,000	0,250*	0,062	1,000
LCM 6111.01	M. E. A. F.	HIV+	<i>C. neoformans</i>	0,500	2,000	0,250*	0,125	2,000
LCM 6112.01	H. R. S.	HIV-	<i>C. gattii</i> (VGII)	0,125	8,000	0,250*	0,062	1,000

Tabela 12 (final) – Isolados clínicos que apresentaram Sensibilidade Dose Dependente e Resistência aos antifúngicos ITR, FLU e 5-FC e ATCCs utilizadas como controle do experimento.

Isolado Clínico (n=21)	Paciente	Sorotipo	Identificação Molecular Final	Determinação da susceptibilidade aos antifúngicos ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				
				AMB	FLU	ITR	VOR	5-FC
LCM 6116.01	N. P. O.	HIV-	<i>C. gattii</i> (VGII)	0,500	8,000	0,250*	0,250	1,000
LCM 6116.02			<i>C. gattii</i> (VGII)	0,500	4,000	0,250*	0,125	1,000
LCM 6116.03			<i>C. gattii</i> (VGII)	0,250	2,000	0,250*	0,125	1,000
LCM 6118.01	E. B. N.	ND	<i>C. neoformans</i> (VNI)	0,125	2,000	0,250*	0,062	1,000
ATCC 32269	SI	SI	<i>C. neoformans</i>	0,062	0,250	0,125	0,062	0,125
ATCC 90112	SI	SI	<i>C. gattii</i>	0,062	0,500	0,125	0,031	0,125
ATCC 22019	SI	SI	NR	0,500	4,000	0,125	0,500	2,000

Legenda: LMC, Laboratório de Micologia Clínica; SI, Sem Informação; HIV+, HIV positivo; HIV-, HIV negativo; ND, sorotipo não determinado; AMB, Anfotericina B; FLU, Fluconazol; ITR, Itraconazol; VOR, Voriconazol; 5-FC, 5-flucitosina; *, isolados clínicos que apresentaram SDD; **, isolados clínicos que apresentaram R; NR, Não Realizado. Fonte: Autoria Própria.

5.5.2 - Análise da susceptibilidade aos antifúngicos entre as espécies de *Cryptococcus*

A susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos foi comparada entre as espécies dos 132 isolados clínicos estudados, sendo 113 (86%) *C. neoformans*, 16 (12%) *C. gattii* e 3 (2%) *C. laurentii* (Apêndice A). Considerando os isolados clínicos que não apresentaram sensibilidade aos antifúngicos, foi observado que entre os 113 isolados clínicos identificados como *C. neoformans*, 8 (7%) apresentaram SDD para o ITR (CIM – 0,250 µg mL⁻¹) e 1 (1%) para o FLU (CIM – 16,000 µg mL⁻¹). Para os 16 isolados clínicos identificados como *C. gattii*, 7 (44%) apresentaram SDD para ITR (CIM – 0,250 µg mL⁻¹) e 2 (12%) para o FLU (CIM – 16,000 µg mL⁻¹). Considerando-se os tipos moleculares de *Cryptococcus* spp., foi observado que a SDD ocorreu para os tipos moleculares VNI (n=8), VGII (n=9) e para 1 isolado clínico *C. neoformans* que não foi possível identificar o tipo molecular. Já para os 3 isolados clínicos identificados como *C. laurentii*, todos apresentaram resistência para a 5-FC (CIM – 64,000 µg mL⁻¹) e 1 isolado clínico apresentou adicionalmente SDD ao ITR (CIM – 0,250 µg mL⁻¹) (Tabela 12). Desta maneira, foi possível observar que tanto *C. neoformans* quanto *C. gattii* apresentaram isolados clínicos com SDD para os azóis ITR e FLU. Enquanto que para os 2 *C. laurentii* identificados neste trabalho, todos os isolados clínicos foram resistentes para a 5-FC sendo que 1 isolado clínico apresentou adicionalmente SDD para o ITR.

A partir das CIMs dos antifúngicos obtidas para cada um dos 132 isolados clínicos, foram determinados os intervalos das CIMs de cada antifúngico para os isolados clínicos da mesma espécie, bem como a menor concentração de cada antifúngico capaz de inibir o crescimento de 50% (CIM50) e 90% (CIM90) da população de isolados clínicos de cada espécie, a média geométrica (MG) e o *value P*. Devido ao reduzido número de isolados clínicos identificados como *C. laurentii* não foi possível avaliar a CIM50, CIM90 e o *value P*. Quando analisado o intervalo das CIMs dos antifúngicos entre as três espécies, foi observado que o FLU apresentou para *C. neoformans* e *C. gattii* intervalos de CIMs de 0,250 – 16,000 µg mL⁻¹ e 0,500 – 16,000 µg mL⁻¹,

respectivamente, onde a CIM de $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ indica SDD ao FLU. Para *C. laurentii*, o intervalo de CIM apresentado para o FLU foi de $2,000 - 4,000 \mu\text{g mL}^{-1}$, que representa sensibilidade a este antifúngico. Para o ITR também foi observado SDD para as três espécies estudadas. Os intervalos das CIMs de ITR foram $0,031 - 0,250 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,062 - 0,250 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,125 - 0,250 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *C. neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii*, respectivamente, onde a CIM de $0,250 \mu\text{g mL}^{-1}$ indica SDD ao ITR. Já para a 5-FC foi observado que apenas *C. laurentii* apresentaram isolados clínicos com resistência (CIM $64,000 \mu\text{g mL}^{-1}$). Ao analisar a CIM50 e CIM90 para *C. neoformans* e *C. gattii*, foi observada sensibilidade a AMB, FLU, VOR e 5-FC. Para o ITR, foi possível observar que 50% e 90% da população dos isolados clínicos de *C. neoformans* foram sensíveis (CIM50 e 90 de $0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$) a este antifúngico. Já para os isolados clínicos de *C. gattii*, 50% da população foi sensível (CIM50 – $0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$) para o ITR enquanto que 90% da população apresentou SDD (CIM90 – $0,250 \mu\text{g mL}^{-1}$) a este antifúngico (Tabela 13).

Foi realizada a análise estatística comparando as CIMs encontradas para *C. neoformans* (n=113) e *C. gattii* (n=16) com o intuito de analisar se havia diferença de sensibilidade entre as espécies de isolados clínicos estudadas (Apêndice A). Nesta análise foram observadas diferenças estatísticas entre as CIMs das duas espécies para os antifúngicos FLU ($P=0,0002$), ITR ($P=0,0003$) e VOR ($P=0,00$). Já para os antifúngicos AMB ($P=0,7884$) e 5-FC ($P=0,8618$) não foram observadas diferenças estatísticas (Figura 22). A partir desta análise estatística entre *C. neoformans* e *C. gattii* foi possível observar que os isolados clínicos de *C. gattii* apresentaram maiores valores de CIMs que os isolados clínicos de *C. neoformans* aos antifúngicos FLU, ITR e VOR.

Tabela 13 – Determinação da susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos de todos os isolados clínicos entre as espécies *C. neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii*.

Antifúngico	$\mu\text{g mL}^{-1}$	<i>C. neoformans</i> (n=113)	<i>C. gattii</i> (n=16)	Value P*	<i>C. laurentii</i> (n=3)
Anfotericina B	Intervalo CIM	0,031 - 1,000	0,031 - 0,500	0,7884	0,125 - 0,500
	CIM50	0,062	0,062		-
	CIM90	0,250	0,250		-
	MG	0,095	0,102		0,198
Fluconazol	Intervalo CIM	0,250 - 16,000	0,500 - 16,000	0,0002*	2,000 - 4,000
	CIM50	1,000	4,000		-
	CIM90	4,000	8,000		-
	MG	1,278	3,512		3,174
Itraconazol	Intervalo CIM	0,031 - 0,250	0,062 - 0,250	0,0003*	0,125 - 0,250
	CIM50	0,125	0,125		-
	CIM90	0,125	0,250		-
	MG	0,095	0,161		0,157
Voriconazol	Intervalo CIM	0,031 - 1,000	0,031 - 1,000	0,0099*	0,125 - 0,500
	CIM50	0,062	0,125		-
	CIM90	0,250	0,250		-
	MG	0,078	0,134		0,314

Tabela 13 (final) – Determinação da susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos de todos os isolados clínicos entre as espécies *C. neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii*.

Antifúngico	$\mu\text{g mL}^{-1}$	<i>C. neoformans</i> (n=113)	<i>C. gattii</i> (n=16)	Value P^*	<i>C. laurentii</i> (n=3)
	Intervalo CIM	0,125 - 4,000	0,500 - 4,000		64,000
5-Flucitosina	CIM50	1,000	1,000	0,8618	-
	CIM90	2,000	2,000		-
	MG	0,935	0,957		64,000

Legenda: Intervalo CIM, menor e a maior Concentração Inibitória Mínima obtida de cada antifúngico para cada espécie; CIM50 e 90, menor concentração capaz de inibir 50 e 90% da população dos isolados clínicos de cada espécie; MG, Média Geométrica; *, diferença estatística obtida apenas das espécies de *C. neoformans* e *C. gattii*; -, dados não realizados. Fonte: Autoria Própria.

Figura 22 – Análise estatística comparando as Concentrações Inibitórias Mínimas dos antifúngicos para os isolados clínicos de *C. neoformans* (n=113) e *C. gattii* (n=16).

Legenda: As barras indicam a média e desvio padrão das CIMs. Os *value P* foi realizado com nível de significância de 5% ($P < 0,05$) pelo teste *Mann-Whitney* e estão indicados nos respectivos gráficos. Dados obtidos através do Programa *GraphPad Prism* v.6.0. Fonte: Autoria Própria.

5.5.3 - Análise da susceptibilidade aos antifúngicos entre os isolados clínicos oriundos dos pacientes sorotipos HIV positivo e HIV negativo com criptococose

Nesta análise foram estudados os isolados clínicos oriundos dos pacientes sorotipo HIV positivo (n=52; 65%) e sorotipo HIV negativo (n=23; 29%), sendo então considerados 1 isolado clínico para cada paciente de acordo com os critérios já descritos no subitem (5.4), totalizando 75 isolados clínicos. Os pacientes que não foi determinado o sorotipo HIV (n=5; 6%) não foram incluídos nesta análise (Apêndice A). Considerando os isolados clínicos que não apresentaram sensibilidade aos antifúngicos, foi observado que entre os 52 isolados clínicos identificados do sorotipo HIV positivo, 3 (6%) apresentaram SDD para o ITR (CIM 0,250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e 2 (4%) para o FLU (CIM 16,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Dos 23 isolados clínicos identificados do sorotipo HIV negativo, 5 (22%) apresentaram SDD para o ITR (CIM 0,250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e 1 (4%)

apresentou resistência para a 5-FC (CIM 64,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Tabela 12). Desta maneira, foi possível observar que tanto os pacientes sorotipo HIV positivo quanto os pacientes sorotipo HIV negativo apresentaram isolados clínicos com SDD para o ITR. Para o FLU apenas os pacientes sorotipo HIV positivo apresentaram isolados clínicos com SDD a este antifúngico. Enquanto que para a 5-FC apenas os pacientes sorotipo HIV negativo apresentaram isolados clínicos com resistência a este antifúngico.

A partir das CIMs dos antifúngicos para os 75 isolados clínicos oriundos de pacientes com sorologia HIV positiva e HIV negativa, foi elaborada uma Tabela. Essas análises foram avaliadas da mesma maneira que a Tabela descrita no subitem anterior (5.5.2). Quando analisado o intervalo das CIMs entre os sorotipos HIV positivo e HIV negativo, foi observado que apenas os isolados clínicos de pacientes sorotipo HIV positivo apresentaram intervalo das CIMs com SDD para o FLU (CIM 0,250 - 16,000), onde a CIM de 16,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ indica a SDD a este antifúngico. Para o ITR, a SDD foi observada entre os isolados clínicos de pacientes sorotipo HIV positivo e sorotipo HIV negativo, sendo que os intervalos das CIMs a este antifúngico, foram os mesmos entre eles, 0,031 – 0,250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Enquanto para a 5-FC apenas os isolados clínicos de pacientes sorotipo HIV negativo apresentaram a este antifúngico intervalo das CIMs com resistência (0,500 – 64,000), onde a CIM de 64,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ indica a resistência a este antifúngico. Ao analisar a CIM50 e CIM90 entre os isolados clínicos de pacientes sorotipos HIV positivo e HIV negativo, foi observado que todos os isolados clínicos foram sensíveis a AMB, FLU, VOR e 5-FC, como foi observado no item anterior. Para o ITR, foi possível observar que 50% e 90% da população dos isolados clínicos provenientes de pacientes sorotipo HIV positivo foram sensíveis (CIM 50 e CIM90 – 0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$) a este antifúngico. Já para os isolados clínicos dos pacientes oriundos sorotipo HIV negativo, 50% da população foi sensível (CIM50 – 0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para o ITR enquanto que 90% da população apresentou SDD (CIM90 – 0,250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) a este antifúngico (Tabela 14).

Tabela 14 – Determinação da susceptibilidade *in vitro* entre os isolados clínicos, oriundos de pacientes sorotipos HIV positivo e HIV negativo aos antifúngicos.

Antifúngicos	$\mu\text{g mL}^{-1}$	HIV positivo (n=52)	HIV negativo (n=23)	Value P*
Anfotericina B	Intervalo CIM	0,031 - 1,000	0,031 - 0,500	0,1424
	CIM50	0,125	0,062	
	CIM90	0,250	0,250	
	MG	0,11	0,082	
Fluconazol	Intervalo CIM	0,250 - 16,000	0,500 - 8,000	0,5516
	CIM50	2,000	1,000	
	CIM90	4,000	8,000	
	MG	1,573	1,435	
Itraconazol	Intervalo CIM	0,031 - 0,250	0,031 - 0,250	0,2628
	CIM50	0,125	0,125	
	CIM90	0,125	0,250	
	MG	0,091	0,109	
Voriconazol	Intervalo CIM	0,031 - 1,000	0,031 - 1,000	0,0123*
	CIM50	0,062	0,125	
	CIM90	0,25	1,000	
	MG	0,078	0,147	
5-Flucitosina	Intervalo CIM	0,125 - 4,000	0,500 - 64,000	0,4334
	CIM50	1,000	1,000	
	CIM90	4,000	2,000	
	MG	1,04	1,351	

Legenda: Intervalo CIM, menor e a maior Concentração Inibitória Mínima obtida de cada antifúngico entre os isolados clínicos oriundos de pacientes sorotipos HIV positivo e HIV negativo; CIM50 e 90, menor concentração capaz de inibir 50 e 90% da população dos isolados clínicos de isolados clínicos oriundos de pacientes sorotipos HIV positivo e HIV negativo; MG, Média Geométrica; *, diferença estatística obtida entre os isolados clínicos de pacientes oriundos do sorotipos HIV positivo e HIV negativo. Fonte: Autoria Própria.

Considerando as espécies, dos 52 isolados clínicos oriundos dos pacientes sorotipo HIV positivo, 50 (96%) isolados clínicos são *C. neoformans* e 2 (4%) são *C. gattii* sendo que apresentaram intervalo das CIMs para o FLU de 0,250 – 16,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 2,000 – 16,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, onde a CIM de 16,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ indica SDD a este antifúngico. Já para os 23 isolados clínicos oriundos dos pacientes sorotipo HIV negativo que foram 15 (65%) *C. neoformans*, 7 (31%) *C. gattii* e 1 (4%) *C. laurentii*, a SDD para FLU não foi observada. Além disso, para o ITR também foi observado SDD entre os isolados clínicos oriundos de pacientes sorotipos HIV positivo (*C. neoformans*) e HIV negativo (*C. neoformans* e *C. gattii*), onde a CIM de 0,250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ indica SDD a este antifúngico. Para a 5-FC, apenas os isolados clínicos *C. laurentii* de pacientes sorotipo HIV negativo apresentaram resistência a este antifúngico, com intervalos das CIMs de 64,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Na análise das CIM50 e CIM90 entre as espécies dos pacientes oriundos dos sorotipos HIV positivo e HIV negativo, como já tinha sido observado, todos os isolados clínicos foram sensíveis a AMB, FLU, VOR e 5-FC. Para o ITR, foi observado que apenas isolados clínicos *C. gattii* oriundos dos pacientes HIV negativo apresentaram 50% e 90% da população dos seus isolados clínicos com SDD (CIM – 0,250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) a este antifúngico (Tabela 15).

Tabela 15 – Determinação da susceptibilidade *in vitro* entre os isolados clínicos dos pacientes sorotipos HIV positivo e HIV negativo, referente às espécies obtidas em cada sorotipo aos antifúngicos.

Antifúngicos	$\mu\text{g mL}^{-1}$	Sorotipo HIV positivo (n=52)		Sorotipo HIV negativo (n=23)		
		<i>C. neoformans</i> (n=50)	<i>C. gattii</i> (n=2)	<i>C. neoformans</i> (n=15)	<i>C. gattii</i> (n=7)	<i>C. laurentii</i> (n=1)
Anfotericina B	Intervalo CIM	0,031 - 1,000	0,125	0,031 - 0,250	0,031 - 0,500	0,125
	CIM50	0,125	-	0,062	0,062	-
	CIM90	0,250	-	0,125	0,250	-
	MG	0,110	0,125	0,073	0,100	-
Fluconazol	Intervalo CIM	0,250 - 16,000	2,000 - 16,000	0,500 - 4,000	0,500 - 8,000	2,000
	CIM50	2,000	-	1,000	4,000	-
	CIM90	4,000	-	2,000	8,000	-
	MG	1,494	5,656	0,954	3,281	-
Itraconazol	Intervalo CIM	0,031 - 0,250	0,062 - 0,125	0,031 - 0,250	0,125 - 0,250	0,125
	CIM50	0,125	-	0,125	0,250	-
	CIM90	0,125	-	0,125	0,250	-
	MG	0,092	0,086	0,084	0,185	-

Tabela 15 (final) – Determinação da susceptibilidade *in vitro* entre os isolados clínicos dos pacientes sorotipos HIV positivo e HIV negativo, referente às espécies obtidas em cada sorotipo aos antifúngicos.

Antifúngicos	$\mu\text{g mL}^{-1}$	Sorotipo HIV positivo (n=52)		Sorotipo HIV negativo (n=23)		
		<i>C. neoformans</i> (n=50)	<i>C. gattii</i> (n=2)	<i>C. neoformans</i> (n=15)	<i>C. gattii</i> (n=7)	<i>C. laurentii</i> (n=1)
Voriconazol	Intervalo CIM	0,031 - 1,000	0,031 - 0,125	0,031 - 1,000	0,062 - 1,000	0,500
	CIM50	0,062	-	0,125	0,125	-
	CIM90	0,250	-	1,000	0,250	-
	MG	0,079	0,061	0,134	0,150	-
5-flucitosina	Intervalo CIM	0,125 - 4,000	0,500 - 1,000	0,500 - 2,000	0,500 - 2,000	64,000
	CIM50	1,000	-	2,000	1,000	-
	CIM90	4,000	-	2,000	1,000	-
	MG	1,057	0,707	1,319	0,820	-

Legenda: Intervalo CIM, menor e a maior Concentração Inibitória Mínima obtida de cada antifúngico entre as espécies de isolados clínicos oriundos de pacientes sorotipos HIV positivo e HIV negativo; CIM50 e 90, menor concentração capaz de inibir 50 e 90% da população dos isolados clínicos de isolados clínicos oriundos de pacientes sorotipos HIV positivo e HIV negativo; MG, Média Geométrica; -, não realizado. Fonte: Autoria Própria.

Da mesma maneira que foi realizado a análise estatística comparando as CIMs encontradas para *C. neoformans* e *C. gattii*, foi elaborada uma análise estatística comparando as CIMs encontradas para os isolados clínicos oriundos de pacientes sorotipos HIV positivo (n=52) e HIV negativo (n=23). O intuito desta análise foi observar diferenças de susceptibilidade entre os isolados clínicos destes pacientes (Apêndice A). Nesta análise foi observado diferença estatística apenas entre as CIMs do antifúngico VOR ($P=0,0123$). Já para os antifúngicos AMB ($P=0,1424$), FLU ($P=0,5516$), ITR ($P=0,2628$) e 5-FC ($P=0,4334$) não foram observadas diferenças estatísticas (Figura 23). Desta maneira, a partir da análise estatística entre os isolados clínicos provenientes de pacientes sorotipo HIV positivo e sorotipo HIV negativo foi possível observar que VOR apresentou maiores valores de CIMs para os isolados clínicos dos pacientes sorotipo HIV negativo do que para os isolados clínicos de pacientes sorotipo HIV positivo.

Figura 23 – Análise estatística comparando as Concentrações Inibitórias Mínimas dos antifúngicos para os isolados clínicos dos pacientes sorotipo HIV positivo (n= 52) e sorotipo HIV negativo (n=23).

Legenda: Isolados clínicos dos pacientes sorotipo HIV positivo e isolados clínicos dos pacientes sorotipo HIV negativo. As barras indicam a média e desvio padrão das CIMs. Os *value P* foi realizado com nível de significância de 5% ($P<0,05$) pelo teste *Mann-Whitney* e estão indicados nos respectivos gráficos. Dados obtidos através do Programa *GraphPad Prism* v.6.0. Fonte: Autoria Própria.

6 - DISCUSSÃO

A criptococose é uma infecção fúngica com risco de vida causada por leveduras encapsuladas do gênero *Cryptococcus*, em geral adquiridas do meio ambiente. As principais espécies que causam a criptococose em humanos são *C. neoformans* e *C. gattii*. Porém, atualmente têm sido observados vários relatos na literatura de outras espécies desse gênero causando infecções em humanos, como, *C. laurentii* e *C. albidus*. Essas espécies representam 80% dos casos relatados como não-*neoformans* e não-*gattii* (JOHNSON; BRADLEY; KAUFFMAN, 1998; KHAWCHAROENPORN; APISARNTHANARAK; MUNDY, 2007; PFALLER et al., 2009; TAKAHARA, 2011; CARDOSO, 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012; KIDD et al., 2016). *C. neoformans* é o principal agente causador da criptococose a qual é considerada uma infecção oportunista que acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos. Por outro lado, *C. gattii* está associado à infecção primária e acomete frequentemente pessoas saudáveis, incluindo crianças (ELLIS; PFEIFFER, 1990; CORREA et al., 1999; DA SILVA et al., 2008; SANTOS et al., 2008; TRILLES et al., 2008; MARTINS et al., 2011; CHEN; MEYER; SORRELL, 2014; DESNOS-OLLIVIER et al., 2015; ESPINEL-INGROFF; KIDD, 2015; AMBURGY et al., 2016; FARRER et al., 2016; LOCKHART; MCCOTTER; CHILLER, 2016; SOUTO et al., 2016; ACHESON, 2017; DA SILVA et al., 2017; NOGUERA; ESCANDON; CASTANEDA, 2017; VÉLEZ; ESCANDON, 2017). *C. laurentii* é considerado um patógeno emergente e acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos, assim como *C. neoformans* (AVERBUCH et al., 2002; KHAWCHAROENPORN; APISARNTHANARAK; MUNDY, 2007; BERNAL-MARTINEZ, et al., 2010; FERREIRA-PAIM et al., 2014).

O presente estudo avaliou 132 isolados clínicos previamente identificados como *Cryptococcus* spp. que foram diagnosticados de 80 casos clínicos de criptococose, provenientes do HCFMRP-USP. Entre os isolados clínicos analisados, foi observado que a maior parte dessas leveduras foram isoladas do LCR. Esse dado está de acordo com a literatura, pois este gênero apresenta uma predileção pelas células do SNC, sendo capaz de atravessar a barreira hematoencefálica do hospedeiro (SLOAN; PARRIS, 2014; COLOMBO; RODRIGUES, 2015; TSENG et al., 2015).

Em razão das limitações no diagnóstico laboratorial clássico que dificultam a identificação final dessas espécies, atualmente, os métodos moleculares têm sido uma ferramenta excelente na identificação de *Cryptococcus* spp. (SAHA et al., 2009). Existem várias ferramentas moleculares utilizadas para diferenciação das espécies e tipos moleculares de *Cryptococcus* (WHITE et al., 1990; AOKI et al., 1999; MEYER et al., 2003; TRILLES et al., 2008; MORA et al., 2010; SANTOS et al., 2010; STEVENSON et al., 2010; CASSAGNE et al., 2011; NEVILLE et al., 2011; SCHOCH et al., 2012). As metodologias que foram utilizadas na diferenciação das espécies neste trabalho foram: (i) PCR; (ii) sequenciamento da região ITS do DNAr; e (iii) MALDI-TOF MS. Apesar de não ser possível diferenciar *C. neoformans* e *C. gattii* pelo sequenciamento da região ITS do DNAr (VU et al., 2016), o dendrograma construído auxiliou nesta identificação. A identificação dos tipos moleculares de *C. neoformans* e *C. gattii* foi realizada por PCR-RFLP. Portanto, por intermédio de técnicas moleculares as espécies dos 132 isolados clínicos deste estudo foram identificadas, sendo elas 113 *C. neoformans*, 16 *C. gattii* e 3 *C. laurentii*. Foi determinado o tipo molecular de 129 (95%) isolados clínicos do nosso estudo, onde 105 são do tipo molecular VNI, 6 VNII e 15 VGII. Entre os 3 isolados clínicos que não foram determinados os respectivos tipos moleculares estão 2 *C. neoformans* e 1 *C. gattii*.

C. neoformans é classificado em duas variedades: *C. neoformans* var. *grubii* (VNI e VNII), *C. neoformans* var. *neoformans* (VNIV) e o híbrido *C. neoformans* var. *grubii* x *C. neoformans* var. *neoformans* (VNIII), ambas apresentam distribuição epidemiológica distintas. A primeira apresenta distribuição mundial (MARTINEZ; GARCIA-RIVERA; CASADEVALL, 2001; FENG et al., 2008; LIN et al., 2008; LIAW; WU; HSUEH, 2009; AGUIAR et al., 2017), a segunda e a última são observadas apenas em algumas regiões (TRILLES et al., 2008; MEYER; TRILLES, 2010). Estudos realizados com isolados de todo o mundo relataram que os tipos moleculares isolados com mais frequência são VNI, VNII, VGI e VGII, sendo que o tipo molecular VNI é o mais isolado (TRILLES et al., 2008; SPRINGER; CHATURVEDI, 2010; MEYER; TRILLES, 2010; COGLIATI et al., 2013). Entre os 132 isolados clínicos estudados neste trabalho, 113 foram identificados como *C. neoformans* var. *grubii*, sendo o tipo molecular VNI mais prevalente e 6 isolados clínicos do tipo molecular VNII. Os dados desse estudo corroboram com a literatura, pois vários autores mostraram a prevalência desta variedade e do tipo molecular

VNI, onde é relatado no território brasileiro e em todos os cinco continentes (TRILLES et al., 2008; MEYER; TRILLES, 2010; MATOS et al., 2012).

C. gattii foi inicialmente isolado em regiões tropicais e subtropicais (ELLIS; PFEIFFER, 1990; DA SILVA et al., 2008) e estudos recentes mostram o isolamento dessa espécie também em regiões temperadas (SPRINGER; BYRNES; CHATURVEDI, 2010; HAGEN et al., 2015) sendo que os tipos moleculares VGI e VGII são os mais prevalentes e isolados de todos os continentes (COGLIATI et al., 2013). No Brasil, é observada uma maior frequência dessa espécie entre as regiões norte e nordeste (MOREIRA et al., 2006; MORA et al., 2012). Neste estudo, dos 16 isolados clínicos identificados como *C. gattii*, 15 foram identificados do tipo molecular VGII e 1 não foi possível determinar o tipo molecular. Os resultados deste trabalho corroboram com os dados que vêm sendo encontrados na literatura, pois segundo os autores Trilles et al. (2008) e Matos et al. (2012) o tipo molecular VGII é mais prevalente entre os isolados clínicos brasileiros.

Atualmente outras espécies de *Cryptococcus* vêm sendo relatadas na literatura como patógenos humanos, por exemplo, *C. albidus* e *C. laurentii* (KIDD et al., 2016). *C. laurentii* é uma levedura comumente considerada saprófita, porém nas últimas décadas surgiram casos de criptococose causadas por essa espécie (FELL et al., 2000; MANFREDI et al., 2006; SHANKAR et al., 2006; ANDRADE-SILVA et al., 2010; DANESI et al., 2014). Em um programa de vigilância nacional para Doenças Fúngicas Invasivas dos Estados Unidos da América foi realizado um estudo com 9.673 leveduras isoladas no período de 2009 a 2014 onde relataram 42 (0,4%) isolados clínicos de *C. laurentii* causadores de criptococose (PFALLER et al., 2009; PFALLER et al., 2011; PFALLER et al., 2013; PFALLER et al., 2015). Em nosso estudo foram observados casos de criptococose causados por *C. laurentii*, dado que corrobora com os dados da literatura que relata a presença desse fungo como patógeno no Brasil, África do Sul, Estados Unidos, Índia e China. Com isto, é possível observar que essa espécie apresenta uma distribuição mundial (MCCULLOH et al., 2011; LOCKHART et al., 2013; WARREN; AMORY; TOBIN, 2014).

Ao analisar a sorologia HIV dos 80 pacientes com caso clínico de criptococose do nosso estudo, foi observado que a maioria (n=52; 65%) apresenta o

sorotipo HIV positivo, enquanto que 23 (29%) apresenta o sorotipo HIV negativo. Entre os pacientes deste estudo, não foi determinada a sorologia HIV de 5 (6%) pacientes, os quais não foram incluídos nesta análise. Entre os isolados clínicos oriundos dos pacientes sorotipo HIV positivo (n=52), a maioria (n=50; 96%) foi identificado como *C. neoformans*. Esses dados corroboram com a literatura, pois essa espécie acomete em maior proporção os indivíduos imunocomprometidos (ELLIS; PFEIFFER, 1990; CORREA et al., 1999; TRILLES et al., 2008; SAIJO et al., 2014) ou com alguma imunossupressão celular (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; LÁZERA et al., 2005). Esses dados também foram os mesmos observados por Morales (2009) e França (2015). Além disso, entre os pacientes sorotipo HIV positivo também foram observados pacientes (n=2; 4%) com isolados clínicos de *C. gattii*. Embora essa espécie seja causadora de infecção primária que acomete frequentemente indivíduos imunocompetentes (ELLIS; PFEIFFER, 1990; CORREA et al., 1999; TRILLES et al., 2008; SAIJO et al., 2014), já é descrito na literatura que *C. gattii* acomete também indivíduos imunocomprometidos, como os portadores do HIV (CHEN et al., 2013). Os tipos moleculares encontrados entre *C. neoformans* e *C. gattii* isolados dos pacientes sorotipo HIV positivo de nosso estudo foram VNI, VNII e VGII, respectivamente. Portanto, é possível observar que a maioria dos isolados clínicos do nosso trabalho são *C. neoformans* VNI e oriundos de pacientes HIV positivo.

Os pacientes sorotipo HIV negativo foram estudados em relação aos dados clínicos e dados demográficos devido às características clínicas desses pacientes, uma vez que é importante conhecer e avaliar a existência de doença de base e/ou subjacente que facilitaram a ocorrência da infecção por *Cryptococcus* spp. Para esses pacientes, a maioria dos isolados clínicos foram identificados como *C. neoformans* (65%), seguido de *C. gattii* (31%) e *C. laurentii* (4%). Os tipos moleculares obtidos entre *C. neoformans* e *C. gattii* foram os mesmos observados em pacientes sorotipo HIV positivo, sendo eles VNI, VNII e VGII. Os dados aqui mostrados indicam que, apesar de *C. neoformans* acometer preferencialmente indivíduos HIV positivo, essa espécie acomete também indivíduos sorotipo HIV negativo, porém com doenças subjacentes como diabetes mellitus, Linfoma não Hodgkin, doença renal, entre outros. Para *C. gattii*, quando considerada a sorologia HIV, foi observada uma maior frequência dessa espécie entre os pacientes sorotipo HIV negativo do que nos pacientes sorotipo HIV positivo. Em estudos realizados por

Favalessa et al. (2014) no Centro Oeste brasileiro também foram observados isolados clínicos *C. gattii* VGII associados a indivíduos sorotipo HIV negativo. Portanto, nossos resultados estão de acordo com a literatura, pois essa espécie afeta mais indivíduos imunocompetentes (ELLIS; PFEIFFER, 1990; CORREA et al., 1999; TRILLES et al., 2008; MEYER; TRILLES, 2010; SAIJO et al., 2014). Já para *C. laurentii*, o isolado clínico identificado neste estudo trata-se de um caso clínico de um neonato prematuro. Embora essa criança tenha sido diagnosticada com o sorotipo HIV negativo, ela apresentou as doenças subjacentes encefalopatia hipóxica e displasia pulmonar, além de neutropenia como fator predisponente para a infecção por esse patógeno. A prematuridade é um dos fatores de risco que predispõe a infecções por micoses invasivas, como por exemplo, a criptococose (BROWN et al., 2012; LIONAKIS; LEVITZ, 2018). Além disso, essa levedura está associada a infecções em indivíduos com doenças de base e/ou doenças subjacente e/ou grave imunocomprometimento do seu sistema imune (JOHNSON; BRADLEY; KAUFFMAN, 1998; KIERTIBURANAKUL; SUNGKANUPARPH; PRACHARKTAM, 2001). Portanto, é possível observar que a maioria dos isolados clínicos oriundos de pacientes HIV negativo deste trabalho também são pertencentes a espécie *C. neoformans* VNI. Além disso, foi observado uma maior taxa de isolados clínicos *C. gattii* VGII entre esses pacientes.

Ao verificar os prontuários clínicos dos pacientes sorotipo HIV negativo foi observado que 87% dos pacientes apresentaram uma ou mais doenças subjacentes que contribuíram para a infecção de *Cryptococcus* spp. Entre esses pacientes a doença mais presente foi a diabetes mellitus (30,4%), o qual corrobora com os dados encontrados por outros autores que mostram que os indivíduos sorotipo HIV negativo apresentam diabetes mellitus como um fator de risco para a infecção por *Cryptococcus* spp. (LEE et al., 2011; MEZZARI et al., 2013). Curiosamente, entre os pacientes sorotipo HIV negativo deste estudo, 1 não apresentou doença subjacente e fator predisponente, apesar da meningite causada por *C. neoformans* VNI. Além deste, outros 2 pacientes não apresentaram doenças subjacentes, mas apresentaram fatores predisponentes. Entre estes, um paciente apresentou drogadição como fator predisponente e meningite causada por *C. neoformans* VNI e o outro paciente que apresentou etilismo como fator predisponente e desenvolveu meningite e pneumonia causada por *C. gattii* VGII. Relacionando o sítio anatômico da infecção e o microrganismo envolvido, estes dados estão de acordo com a

literatura, uma vez que *C. neoformans* é grande causador de meningocefalite, em contraste ao *C. gattii* que ocorre mais frequentemente em infecções pulmonares. Entretanto, a ocorrência de meningite por *C. neoformans* em paciente imunocompetente é considerada pouco frequente (KWON-CHUNG et al., 2014). Lee et al. (2011) também encontraram pacientes que não apresentaram nenhuma doença que contribuiu para que a criptococose ocorresse. Embora os pacientes que não apresentam nenhum tipo de doença subjacente e/ou de base sejam em menor quantidade, é importante destacar que a criptococose também afeta pessoas saudáveis.

Entre os fatores predisponentes dos pacientes HIV negativo foi observado em nosso trabalho que 70% apresentou um ou mais fatores que contribuíram para a infecção por *Cryptococcus* spp. Os fatores que apareceram em maior proporção foram: insuficiência renal (18,2%) e neutropenia (13,6%). Por outro lado, para 30% dos pacientes de nosso estudo não foram relatados fatores predisponentes para essa infecção. Estudos realizados por Lee et al. (2011) observaram que a insuficiência renal é considerada um dos principais fatores de risco para criptococose nos pacientes sorotipo HIV negativo. Esses dados mostraram uma relação entre os dados obtidos nesse estudo, pois também foram observados isolados clínicos com esse fator predisponente. Ao analisar os quadros clínicos dos pacientes sorotipo HIV negativo foi observado que os pacientes apresentaram um ou mais quadros clínicos de criptococose. Entre os quadros clínicos, o mais prevalente foi a meningite (38%). Nossos dados estão de acordo com os dados encontrados na literatura, pois o principal quadro clínico da criptococose é a meningite e/ou meningoencefalite, devido ao tropismo que as espécies de *Cryptococcus* têm pelas células nervosas do SNC do indivíduo (VERONESI, 2005; DESALERMOS; KOURKOUMPETIS; MYLONAKIS, 2012; BOULWARE et al., 2014).

No presente estudo, ao analisar a evolução da criptococose entre os pacientes sorotipo HIV negativo, foi observado que a maioria dos pacientes (52%) foram a óbito, 31% dos pacientes foram curados e 17% dos pacientes não apresentaram seguimento, não sendo possível relatar a evolução da doença. Estima-se que a criptococose afeta aproximadamente 220.000 indivíduos, provocando em torno de 180.000 mortes por ano causadas por essa enfermidade. Esses pacientes frequentemente se apresentam com essa doença disseminada (SRICHATRAPIMUK; SUNGKANUPARPH, 2016; RAJASINGHAM et al., 2017).

Além disso, os indivíduos infectados pelo HIV são mais favoráveis ao desenvolvimento da criptococose, e isso está altamente relacionada a elevados índices de óbitos nessa população (ALMEIDA; MACHADO, 2014; SLOAN; PARRIS, 2014; RAJASINGHAM et al., 2017). Com esses dados é possível evidenciar que a infecção por criptococose pode levar a óbito tanto indivíduos portadores do HIV/AIDS quanto indivíduos não portadores do HIV.

Ao verificar a faixa etária e o gênero entre os pacientes sorotipo HIV negativo desse estudo, foi observada a faixa etária entre 0 a 81 anos de idade com a média de 52 anos de idade. O intervalo de idade que apresentou maior incidência de criptococose foi entre 51 e 60 anos, seguido de 71 e 80 anos. Mezzari et al. (2013) e França (2015) observaram uma faixa etária entre 30 a 59 anos de idade, diferente da encontrada em nosso trabalho. Mora et al. (2012) observaram uma faixa etária parecida com esses autores, sendo entre 31 a 40 anos de idade. Entretanto, Brown et al. (2012) e Lionakis e Levitz (2018) relataram faixas etárias semelhantes ao nosso trabalho, onde evidenciaram que a idade avançada também é fator que contribui para o desenvolvimento desta infecção. Em relação ao gênero dos pacientes, foi observado que 70% dos pacientes sorotipo HIV negativo são do gênero masculino e 30% são do gênero feminino. Os dados encontrados em nosso estudo também foram observados por outros autores, onde os mesmos verificaram que a criptococose afeta em maior proporção os indivíduos do gênero masculino (VERONESI, 2005; FRANÇA, 2015), sendo esta prevalência relatada tanto na literatura brasileira quanto na literatura mundial (CHEN et al., 2000; MIRZA et al., 2003; DROMER et al., 2004, MILLOGO et al., 2004, ANTINORI et al., 2009; ALMEIDA, 2012, MEZZARI et al., 2013).

Os fatores importantes para a ocorrência da infecção fúngica no hospedeiro são atribuídos ao *status* imune do hospedeiro e aos fatores de virulência do fungo (GOLDMAN; LEE; CASADEVALL, 1994). São vários os fatores de virulência que contribuem para a infecção pelo gênero *Cryptococcus*, por exemplo, a termotolerância a 37°C, a cápsula polissacarídica e a melanina (GOLDMAN; LEE; CASADEVALL, 1994; STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003; KRONSTAD et al., 2011; KWON-CHUNG et al., 2014; BIELSKA; MAY, 2016), sendo estes fatores os mais estudados (BIELSKA; MAY, 2016). Os fatores de virulência contribuem de diferentes maneiras para a instalação do fungo no hospedeiro (PEDROSO et al.,

2010b). A capacidade de sobreviver a 37°C contribui para a colonização do patógeno em órgãos e tecidos animais (FILION; KIDD; AGUIRRE, 2006), a cápsula polissacarídica, que é o principal fator de virulência das espécies de *Cryptococcus* (MCCLELLAND; BERNHARDT; CASADEVALL, 2005), apresenta função antifagocitária (VECCHIARELLI, 2000; MCCURDY; MORROW, 2001) e a melanina é encontrada na parede celular fúngica e auxilia na evasão do sistema imune, além de diminuir a sensibilidade à terapia antifúngica (IKEDA et al., 2002; ITO-KUWA et al., 2008; LIAW; WU; HSUEH, 2009; EISENMAN; CASADEVALL, 2012). Em nosso estudo foram realizadas avaliações *in vitro* da cápsula polissacarídica e da produção de melanina de todos os isolados clínicos, além disso, também foi realizado a comparação de cada fator de virulência estudado em relação às espécies de *Cryptococcus* e em relação aos pacientes sorotipo HIV positivo e HIV negativo.

A cápsula polissacarídica dos 132 (100%) isolados clínicos foi avaliada quanto a porcentagem linear da mesma. Foram avaliados 113 *C. neoformans* e 16 *C. gattii*. Os 3 isolados clínicos identificados como *C. laurentii* não produziram cápsula polissacarídica nas condições testadas do experimento. Em estudos realizados por Pedroso et al. (2010b), os autores relataram que *C. laurentii*, quando analisado em microscopia, apresenta-se com cápsula polissacarídica menor que *C. neoformans*. Ao comparar a média da porcentagem linear da cápsula polissacarídica entre os isolados clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii*, não foi constatada diferença estatística entre a porcentagem linear da cápsula dessas espécies. Entretanto, quando comparada a porcentagem linear da cápsula polissacarídica entre os isolados clínicos dos pacientes sorotipos HIV positivo (n=52) e negativo (n=23) foi observada uma diferença estatística, onde os isolados clínicos de pacientes sorotipo HIV positivo apresentaram maior porcentagem linear da cápsula polissacarídica em relação aos isolados clínicos de pacientes sorotipo HIV negativo, independente da espécie estudada. Essa diferença é devido ao isolado clínico *C. laurentii* (LMC 6048.01) oriundo de paciente sorotipo HIV negativo que não apresentou produção de cápsula polissacarídica. Assim, podemos observar que a maioria dos isolados clínicos do sorotipo HIV positivo e HIV negativo apresentaram cápsula polissacarídica e independente do sorotipo foi observado tamanhos distintos entre as mesmas. Para 1 isolado clínico do sorotipo HIV negativo (*C. laurentii*) nas

condições testadas do experimento foi observado ausência de cápsula polissacarídica.

Pesquisadores compararam a produção de melanina em pacientes com criptococose persistente e/ou recorrente e não observaram nenhuma associação causal relacionadas a infecção nesses indivíduos (CLANCY et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2016). Em outros estudos, pesquisadores observaram que as células melanizadas de *C. neoformans* apresentam mais resistência à fagocitose, e com isto, são menos suscetíveis a AMB, em relação as células não melanizadas (WANG; CASADEVALL, 1994; WANG, AISEN; CASADEVALL, 1995). Além disso, é relatado que a alta atividade da enzima lacase que pertence a via de síntese da melanina em *C. neoformans*, aumenta a sobrevivência intracelular dentro dos macrófagos proporcionando resistência aos antifúngicos (SABIITI et al., 2014). Na análise da produção de melanina dos 132 isolados clínicos, foi verificado que todos os isolados clínicos deste trabalho apresentaram a produção da mesma. Foi observado que a maioria dos isolados clínicos apresentaram alta intensidade de produção de melanina, seguida de média produção de melanina. Nossos achados corroboram com Thompson et al. (2014) e Brilhante et al. (2017), que relataram nenhuma diferença significativa na produção de melanina entre essas espécies. Inclusive, nesse estudo os autores não observaram nenhuma diferença na produção de melanina entre os tipos moleculares VNI, VGI e VGII. Adicionalmente, nosso estudo observou baixa produção de melanina entre alguns isolados clínicos de *C. neoformans* e *C. laurentii*. Há relatos na literatura que *C. laurentii* apresenta ausência (PEDROSO et al., 2007) ou baixa produção de melanina (PEDROSO et al., 2007, PEDROSO et al., 2009; ANDRADE-SILVA et al. 2010; MENEZES; PENATTI; PEDROSO, 2011). Portanto, em nosso estudo podemos constatar que todos os isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. testados foram produtores de melanina.

Variações genótípicas de *C. neoformans* var. *grubii*, mesmo pequenas, podem, dentro do hospedeiro, ser acompanhadas de alterações na expressão dos fatores de virulência e da susceptibilidade aos antifúngicos pertencentes a classe dos azóis (ILLNAIT-ZARAGOZI et al., 2010; ORMEROD et al., 2013). Em estudos realizados com os diferentes tipos moleculares de *C. gattii*, foi relatado que a produção de melanina está relacionada à virulência dessas linhagens (FIRACATIVE; DUAN; MEYER, 2014). Assim, decidimos observar se os fatores de virulência

melanina e cápsula polissacarídica influenciam na virulência de *Cryptococcus* sp. Considerando que os experimento *in vivo* em modelos eucariotos murinos (CLANCY et al., 2006) e *G. mellonella* (MYLANOKIS et al., 2005; O'MEARA; ALSPAUGH, 2012) podem explorar melhor estes resultados do que os experimentos *in vitro* (CLANCY et al., 2006; O'MEARA; ALSPAUGH, 2012), avaliamos a virulência de isolados clínicos oriundos de pacientes sorotipo HIV negativo e pacientes sorotipo HIV não determinado no modelo experimental de virulência *G. mellonella*. Como resultado observamos que a maioria dos isolados clínicos testados foram considerados muito virulentos, seguidos de alguns com virulência intermediária e outros considerados pouco virulentos. Entre os isolados clínicos considerados muito virulentos estão 10 *C. neoformans*, sendo 8 VNI, 1 VNII e 1 isolado clínico que não foi possível identificar o tipo molecular, além de 5 *C. gattii* VGII. Os considerados com virulência intermediária foram 3 *C. neoformans*, sendo 2 VNI e 1 isolado clínico que não foi possível identificar o tipo molecular, além de 5 *C. gattii* VGII e 2 *C. laurentii*. Os que apresentaram baixa virulência foram 7 *C. neoformans* VNI e 1 *C. gattii* VGII. Desta maneira, foi observado que *C. neoformans* apresentou isolados clínicos mais virulentos do que *C. gattii*. Os isolados clínicos dessas duas espécies apresentaram tanto melanina como cápsula polissacarídica, sendo a primeira em alta produção de melanina e a segunda em distintos tamanhos. Assim, podemos sugerir que a virulência destes isolados clínicos não é alterada pela variação na produção de melanina e tamanho de cápsula polissacarídica. Já para *C. laurentii*, foi observado que os 2 isolados clínicos apresentaram virulência intermediária. Estes isolados clínicos apresentaram baixa intensidade de produção de melanina e ausência de cápsula polissacarídica. Portanto, podemos observar que a ausência da cápsula polissacarídica não inviabilizou a virulência destes isolados clínicos.

Analizamos também a variação da virulência de isolados clínicos oriundos do mesmo paciente. Assim, 5 pacientes com o sorotipo HIV negativo foram selecionados e 2 isolados clínicos de cada foram analisados quanto a sua virulência em larvas de *G. mellonella*. Entre estes, foram analisados 6 isolados clínicos *C. gattii* VGII provenientes de 3 pacientes e 4 isolados clínicos *C. neoformans* VNI provenientes de 2 pacientes. A análise estatística mostrou que os isolados clínicos de *C. gattii* dos pacientes J. A. S. B. (LMC 6088.01 e LMC 6088.02), L. S. (LMC 6098.01 e LMC 6098.03) e N. P. O. (LMC 6116.03 e LMC 6116.04) não

apresentaram diferença na curva de sobrevivência das larvas infectadas com esses isolados clínicos, isto é, apresentaram semelhantes perfis de virulência. Entretanto, ao comparar os isolados clínicos *C. neoformans* dos pacientes J. M. B. (LMC 6068.01 e LMC 6068.02) e J. M. S. (LMC 6091.01 e LMC 6091.02), foi observada diferença estatística na curva de sobrevivência das larvas infectadas com esses isolados clínicos. Desta maneira, foi observado que para dois pacientes, os isolados clínicos tiveram alteração no perfil de virulência e os isolados clínicos foram *C. neoformans* VNI.

Em nosso estudo, ao avaliar a susceptibilidade *in vitro* dos 132 isolados clínicos de *Cryptococcus* spp., verificou-se que a maioria dos isolados clínicos foram sensíveis aos antifúngicos AMB, VOR, ITR, FLU e 5-FC, excetuando 21 (16%) isolados clínicos que apresentaram SDD e resistência para ITR, FLU ou 5-FC. Entre os isolados clínicos que apresentaram SDD para o ITR estão *C. neoformans* VNI, *C. gattii* VGII e *C. laurentii*. Para o antifúngico FLU foi observado SDD apenas para *C. neoformans* VNI e *C. gattii* VGII. Já para a 5-FC todos os isolados identificados como *C. laurentii* apresentaram resistência a este antifúngico. Apesar de, termos encontrado sensibilidade à AMB, a resistência de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. a este antifúngico vem sendo observada (ANDRADE-SILVA et al., 2013; KIDD et al., 2016). A resistência à AMB dos tipos moleculares VNI e VGII foram registradas na região Centro Oeste do Brasil (JÚNIOR, 2016). Resultado divergente foi relatado pelo nosso grupo de pesquisa que mostrou o não isolamento de *Cryptococcus* spp. resistentes à AMB (NASCIMENTO et al., 2017), revelando que os isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. da região nordeste do estado de São Paulo são sensíveis à AMB. Estes dados corroboram com os dados encontrados no nosso trabalho. Além disso, para *C. laurentii* a sensibilidade e a resistência também vem sido registrada (KELLY et al., 1994; BANERJEE et al., 2013; KIDD et al., 2016), sendo nossos resultados concordantes com os dados que registra a sensibilidade de *C. laurentii* à AMB.

Para o antifúngico VOR, os dados de nosso estudo corroboram com os dados da literatura, onde *C. neoformans* e *C. gattii* demonstram-se sensíveis a este antifúngico (ESPINEL-INGROFF et al., 2012b; HERKERT et al., 2016; HERKERT et al., 2018). Em um estudo realizado na Austrália foi observado que as espécies *C. albidus*, *C. laurentii*, *C. gattii* e *C. neoformans* foram sensíveis a este antifúngico,

com a exceção de um isolado *C. laurentii* que apresentou resistência ao VOR (KIDD et al., 2016). Os isolados clínicos *C. laurentii* de nosso estudo são sensíveis ao VOR, sendo concordante com os dados encontrados por Banerjee et al. (2013).

Alguns isolados clínicos de nosso trabalho, todos eles *C. neoformans* VNI, apresentaram SDD para o ITR. No caso desta espécie, esses mesmos dados foram observados na literatura tanto para isolados ambientais (ESPINEL-INGROFF et al., 2012b) quanto para isolados clínicos (HERKET et al., 2018). Entre todos os isolados clínicos identificados em nosso trabalho como *C. gattii*, 44% apresentaram SDD a este antifúngico, sendo todos eles do tipo molecular VGII. Os dados obtidos nesse trabalho são semelhantes aos relatados por Espinel-Ingroff (2012b), onde analisaram 371 isolados ambientais do tipo molecular VGII, sendo 211 isolados identificados com SDD e inclusive esses autores observaram 20 casos de isolados ambientais com resistência a este antifúngico. Já em estudos realizados por Herkert et al. (2016), com 18 isolados de *C. gattii* VGII, todos foram sensíveis ao ITR. Em nosso estudo, ao comparar as CIMs dessas duas espécies foi observado que o ITR apresentou maiores CIMs para os isolados clínicos de *C. gattii* do que para os isolados clínicos de *C. neoformans*. Nossos dados assemelham-se com os dados encontrados em um trabalho do nosso grupo de pesquisa, onde foram analisados um total de 68 isolados clínicos de *Cryptococcus* spp., sendo 61 isolados clínicos identificados como *C. neoformans* var. *grubii* e 7 como *C. gattii* e entre essas duas espécies foi observada maiores valores de CIMs para *C. gattii* (NACIMENTO et al., 2017). Entre os 3 isolados clínicos identificados como *C. laurentii* em nosso trabalho, somente 1 apresentou SDD para o ITR. Esses dados também foram observados em um estudo realizado por Kidd et al. (2016) na Austrália, onde em um total de 7 isolados *C. laurentii*, 3 apresentaram SDD e 1 apresentou resistência ao ITR.

Em nosso estudo também foram observados isolados clínicos de *C. neoformans* VNI e *C. gattii* VGII com SDD para o FLU. O aumento significativo de linhagens SDD e resistentes ao FLU vêm sendo registrado desde a década de 90. Elevadas taxas de resistência foram notificadas principalmente na Ásia, África e América Latina, sendo que na Europa e América do Norte mostraram menores taxas. Essas elevadas taxas provavelmente ocorrem devido ao uso indiscriminado do FLU nesses países, podendo gerar a resistência a este antifúngico (MPOZA; RHEIN; ABASSI, 2018). Além disso, a utilização de fungicidas azoles (propiconazol, tebuconazol, difenconazol, epoxiconazol e bromuconazol) na agricultura pode levar

à pressão seletiva de fungos expostos a esses compostos, ocasionando, assim, a resistência aos antifúngicos na clínica (TAKAHASHI; MELHEM, 2014; HOLLOMON, 2017). A resistência ao FLU ainda é pouco compreendida, porém sabe-se que pode haver mutações no gene *ERG11*, o qual o estudo até o momento é mais explorado em espécies de *Candida* (CHOWDHARY et al., 2018). Em um estudo realizado com 1.137 isolados ambientais de *C. neoformans* VNI, foi verificada a SDD para 33 isolados, além disso, foi observada resistência de 13 isolados ambientais a este antifúngico. Já em um total de 449 isolados ambientais de *C. gattii* VGII também foi observada a SDD e resistência a este antifúngico (ESPINEL-INGROFF et al., 2012b). Em nosso estudo apenas 3 isolados clínicos entre as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* apresentaram SDD ao FLU. Os 3 isolados clínicos *C. laurentii* de nosso estudo foram sensíveis ao FLU. Entretanto, a resistência primária ao FLU para isolados não-*neoformans* e não-*gattii* é relatado como frequente (Pedroso et al., 2010b), onde isolados não-*neoformans* e não-*gattii*, como *C. albidus* e *C. laurentii*, apresentam SDD e resistência a este antifúngico (KIDD et al., 2016). Portanto, diferente do que é relatado na literatura, em nosso estudo não foram encontrados isolados clínicos *C. laurentii* SDD ou resistentes ao FLU.

Desde o início da utilização da 5-FC no tratamento da criptococose foram relatados isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. resistentes a este antifúngico. Mesmo assim, a sua utilização associada a AMB apresenta uma alta eficácia no tratamento (LÁZERA et al., 2005). Em nosso estudo, todos os isolados clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii* foram sensíveis a 5-FC. Estudos realizados em isolados clínicos da região Sudeste do Brasil mostraram *C. neoformans* VNI com SDD para 5-FC (HERKERT et al., 2018). Além disso, em estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa com isolados clínicos de *C. neoformans* var. *grubii* e *C. gattii* foi observada SI para 5-FC (NASCIMENTO et al., 2017). Os dados de nosso trabalho não corroboram com os relatos na literatura, uma vez que todos os isolados clínicos *C. neoformans* e *C. gattii* foram sensíveis a 5-FC. *C. laurentii* é relatado como uma espécie resistente à 5-FC, tanto em isolados da Austrália, Espanha, Índia e Brasil (BERNAL-MARTINEZ et al., 2010; BANERJEE et al., 2013; LIMA, 2014). Todos os isolados clínicos de *C. laurentii* de nosso estudo apresentaram resistência a este antifúngico, corroborando com os dados encontrados na literatura.

Como anteriormente mencionado, em geral a maioria dos isolados clínicos do nosso trabalho foram sensíveis aos antifúngicos AMB, FLU, ITR, VOR e 5-FC.

Entretanto, ao comparar os valores da CIM dos antifúngicos para os *C. neoformans* e *C. gattii*, o último necessita de maiores valores de CIMs dos antifúngicos FLU, ITR, VOR para ser inibido em comparação com *C. neoformans*, mostrando então uma possível dificuldade no tratamento de infecção por esta espécie e possível necessidade de tratamento antifúngico mais prolongado. Embora existam diferenças significativas entre o complexo de *C. neoformans* e *C. gattii*, o tratamento antifúngico recomendado é o mesmo para ambos complexos. Porém, alguns especialistas sugerem que o tratamento das infecções causadas por *C. gattii* seja mais prolongado na indução e na consolidação (TRILLES et al., 2014; SRICHATRAPIMUK; SUNGKANUPARPH, 2016). As diferenças na susceptibilidade *in vitro*, entre as espécies de *C. neoformans* e *C. gattii* e seus tipos moleculares já são observadas na literatura (ESPINEL-INGROFF et al., 2012a; ESPINEL-INGROFF et al., 2012b; TRILLES et al., 2012; HERKERT et al., 2018). Em estudos realizados por Hagen et al. (2016), foi observado que os isolados clínicos de *C. gattii* apresentam-se menos suscetíveis aos antifúngicos da classe dos azóis do que isolados clínicos de *C. neoformans*. Em nosso estudo essa relação também foi observada. Assim, podemos concluir que *C. gattii* necessita de valores maiores de CIMs para ser inibida.

Em nosso estudo foi observado que 65% dos pacientes que apresentaram criptococose tinham resultado positivo para a sorologia HIV. Os nossos resultados estão de acordo com o que é encontrado na literatura, pois autores relatam que os pacientes portadores do vírus HIV apresentam maior prevalência no desenvolvimento da criptococose e são tratados com a terapia inicial de AMB, com ou sem associação com a 5-FC, seguido da monoterapia de manutenção com FLU (DISMUKES, 1993; ALVES et al., 1997; PERFECT; COX, 1999; SAAG et al., 2000; PERFECT et al., 2010).

Os isolados clínicos dos pacientes sorotipo HIV positivo e sorotipo HIV negativo foram comparados quanto as respectivas susceptibilidades aos antifúngicos. Como já mencionado anteriormente, a maioria dos casos de criptococose ocorreram em pacientes sorotipo HIV positivo, sendo que a grande maioria (96%) dos isolados clínicos foram *C. neoformans*. *C. gattii* representou 4% dos isolados clínicos de pacientes sorotipo HIV positivo. Em contrapartida, os pacientes sorotipo HIV negativo apresentaram a distribuição de 65% *C. neoformans*,

30% *C. gattii* e 5% *C. laurentii*. Quanto à susceptibilidade aos antifúngicos, os isolados clínicos oriundos dos pacientes sorotipos HIV positivo e negativo apresentaram SDD para ITR. Sendo, 2 *C. neoformans* VNI e 1 *C. neoformans* sem o tipo molecular determinados foram isolados de pacientes sorotipo HIV positivo e 4 *C. neoformans* VNI e 1 *C. gattii* VGII foram isolados de pacientes sorotipo HIV negativo. Para FLU, dois isolados clínicos de paciente HIV positivo apresentaram SDD, sendo 1 *C. neoformans* VNI e 1 *C. gattii* VGII. Uma resistência foi observada para 5-FC de 1 isolado clínico *C. laurentii* oriundo de paciente sorotipo HIV negativo. Cogliati (2013) observou que a susceptibilidade *in vitro* de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. provenientes de pacientes sorotipo HIV positivo e pacientes sorotipo HIV negativo foram sensíveis aos antifúngicos AMB e VOR. Entretanto, 15% destes isolados clínicos foram SDD ou resistentes ao ITR, FLU e 5-FC. Dados na literatura mostram que em Ribeirão Preto e região o ITR apresenta maiores valores de CIMs para os isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. de pacientes sorotipo HIV negativo do que dos pacientes portadores do HIV (NASCIMENTO et al., 2017). Em nossos dados, foi observado que tanto os pacientes sorotipo HIV positivo quanto os pacientes sorotipo HIV negativo apresentaram isolados clínicos com SDD para o ITR. Li et al. (2012) observou que pacientes com HIV/AIDS apresentaram menor susceptibilidade ao antifúngico FLU, quando comparados aos pacientes HIV negativo. Em nosso estudo também foi verificado esse dado, além disso, foi observado que apenas os pacientes HIV positivo apresentaram isolados clínicos com SDD a este antifúngico. Estudos realizados por Arsic et al. (2014) mostraram que os pacientes HIV negativo apresentaram menor susceptibilidade para o antifúngico 5-FC do que os pacientes sorotipo HIV positivo. Em nosso estudo foi observado que apenas os pacientes do sorotipo HIV negativo apresentaram isolados clínicos com resistência a este antifúngico.

A partir da análise estatística comparando os isolados clínicos dos pacientes de nosso estudo, foi observado que apenas o antifúngico VOR apresentou maiores valores de CIMs para os isolados clínicos de pacientes sorotipo HIV negativo do que para os isolados clínicos de pacientes sorotipo HIV positivo. Em estudos realizados por Nascimento et al. (2017) os dados encontrados foram semelhantes ao nosso, pois esses autores também relataram que os pacientes HIV negativo apresentaram maiores valores de CIMs a este antifúngico do que os pacientes portadores do HIV.

No tratamento com AMB, principalmente em pacientes com HIV/AIDS, ocorre uma resposta lenta (AGUIAR et al., 2017). Recentemente, um caso de paciente HIV positivo com dificuldade no tratamento da criptococose foi relatado. Neste, foi isolada a levedura *C. neoformans* resistente ao FLU. O tratamento foi realizado com FLU e AMB durante 16 meses sem nenhuma evolução clínica, levando o paciente a óbito (MPOZA; RHEIN; ABASSI, 2018). Além disso, é notável que o amplo uso de antifúngicos da classe dos azóis nos indivíduos imunocomprometidos vem contribuído para o surgimento de resistência para esta classe de antifúngico. A resistência primária para os antifúngicos FLU e 5-FC em isolados não-*neoformans* e não-*gattii* aparentam ser mais frequente (PEDROSO et al., 2010b). Em nosso estudo, a resistência foi observada apenas para os isolados clínicos *C. laurentii*, além disso, esse perfil foi demonstrado apenas para a 5-FC.

A infecção por *Cryptococcus* spp. é considerada fatal sem um tratamento adequado. Em vista disso, um diagnóstico rápido e o tratamento adequado são essenciais para diminuir a mortalidade entre os indivíduos acometidos por essa infecção (LEE et al., 2011). A falta de diferenciação entre os genótipos isolados e a diversidade de indivíduos acometidos pela criptococose dificultam o desfecho de possíveis diferenças entre os isolados clínicos de pacientes com HIV/AIDS e pacientes sorotipo HIV negativo quanto aos antifúngicos utilizados no tratamento da criptococose (NASCIMENTO et al., 2017). Por isso, é de suma importância compreender a patogenia, virulência, susceptibilidade aos antifúngicos e epidemiologia das diferentes espécies de *Cryptococcus*, assim como é importante investigar os dados clínicos e demográficos do hospedeiro acometido pela criptococose, já que a infecção varia de acordo com o *status* imune do indivíduo.

Portanto, aqui neste trabalho constatamos que não houve diferenças distintas ao correlacionar os fatores de virulência (cápsula polissacarídica e melanina) e virulência em modelo animal alternativo (*G. mellonella*) entre os isolados clínicos estudados. Além disso, a maioria dos isolados clínicos deste trabalho apresentaram-se sensíveis aos antifúngicos utilizados na clínica para o tratamento da criptococose.

7 - CONCLUSÃO

- Maioria (65%) dos isolados clínicos são oriundos de pacientes sorotipo HIV+;
- Maioria (53%) das leveduras foram isoladas do LCR;
- Maioria (86%) dos isolados clínicos foram identificados como *C. neoformans* var. *grubii* VNI;
- Não houve diferença no tamanho da cápsula polissacarídica ao comparar entre as espécies de *C. neoformans* e *C. gattii*. Todos isolados clínicos identificados como *C. laurentii* não apresentaram cápsula polissacarídica nas condições testadas do experimento;
- Todos os isolados clínicos produziram melanina;
- 16% dos isolados clínicos apresentaram SDD ou resistência para FLU, ITR e 5-FC;
- Não houve diferença ao correlacionar os fatores de virulência *in vitro* (cápsula polissacarídica e produção de melanina) e a virulência *in vivo* (*G. mellonella*);
- São necessários estudos adicionais entre os isolados clínicos que apresentaram diferença na susceptibilidade aos antifúngicos.

REFERÊNCIAS¹

- ABREU, S. R. O. et al. **Comparação genotípica e fenotípica de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de caprinos e ovinos do Sertão de Pernambuco.** *Pesq. Vet. Bras.*, Recife, v. 28, n. 10, p. 481-487, 2008.
- ACHESON, E. S. ***Searching for clues for eighteen years: deciphering the ecological determinants of *Cryptococcus gattii* on Vancouver Island, British Columbia.*** *Med. Mycol.*, Colômbia, v. 56, n. 2, p. 129-144, 2017.
- AGUIAR, P. A. D. F. D. **Caracterização de amostras de *Cryptococcus neoformans* e aspectos clínicos e epidemiológicos da criptococose de pacientes do Hospital das Clínicas de Uberlândia.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 89 f., 2016.
- AGUIAR, P. A. D. F. D. et al. ***The epidemiology of cryptococcosis and the characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated in a Brazilian, University Hospital.*** *Rev. Ins. Med. Trop.*, São Paulo, v. 59, n. 13, p. 1-9, 2017.
- ALMEIDA, J. C. D. **Perfil clínico-epidemiológico da Criptococose em pacientes HIV positivos atendidos em uma unidade de referência em Belém do Pará.** Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais). Universidade Federal do Pará, Núc. Med. Trop., Belém, p. 77, 2012.
- ALMEIDA, R. L. G.; MACHADO, E. R. ***Cryptococcus spp. in patients with HIV/AIDS: literature review.*** *Cienc. Biol. Agrar. Saúde.*, v. 18, n. 1, p. 55-63, 2014.
- ALVES, S. H. et al. ***Development of secondary resistance to FLUe in *Cryptococcus neoformans* isolated from patient with AIDS.*** *Rev. Inst. Med. Trop.*, São Paulo, v. 39, n. 6, p. 359-362, 1997.
- ALVES, S. H.; GRIEBELER, J.; GOULART, L. S. **Aspectos atuais da resistência aos antifúngicos azólicos e poliênicos.** *Infarm.*, Brasília, v. 15, n. 3-4, p. 75-77, 2002.
- AMBURGY, J. W. et al. ***Case Report *Cryptococcus gattii* in an Immunocompetent patient in the Southeastern United States.*** *Infect. Dis.*, Estados Unidos da América, v. 16, p. 4, 2016.
- ANAISSE, E. J.; MCGGINNIS, M. R; PFALLER, M. A. ***Clinical mycology.*** Elsevier., 2009.
- ANDRADE-SILVA, L. et al. ***Molecular characterization and evaluation of virulence factors of *Cryptococcus laurentii* and *Cryptococcus neoformans* strains isolated from external hospital areas.*** *Fungal Biol.*, Minas Gerais, v. 114, n. 5-6, p. 438-445, 2010.
- ANDRADE-SILVA, L. et al. **Susceptibility profile of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Uberaba.** Minas Gerais, *Med. Mycol.* v. 51, n. 6, p. 635–640, 2013.
- ANTINORI, S. et al. ***AIDS associated cryptococcosis: a comparison of epidemiology, clinical features and outcome in the pré-and post- HAART eras. Experience of a single centre in Italy.*** *HIV Med.*, Itália, v. 10, n. 1, p. 6-11, 2009.
- AOKI, F.H. et al. ***New PCR primer pairs specific for *Cryptococcus neoformans* serotype A or B prepared on the basis of random amplified polymorphic DNA fingerprint pattern analyses.*** *J. Clin. Microb.*, Campinas, v. 37, n. 2, p. 315-320, 1999.
- ARSIC, A. V. et al. ***Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of Serbian *Cryptococcus neoformans* isolates.*** *Myc.*, Sérvia, v. 57, n. 6, p. 380-7, 2014.
- AUSUBEL, F. M. et al. ***Current Protocols in Molecular Biology***, 1993.
- AVERBUCH D. et al. ***Fungemia in a cancer patient caused by FLUeresistant *Cryptococcus laurentii*.*** *Med. Mycol.*, Holanda, v. 40, n. 5, p. 479-484, 2002.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- BAHN, Y. S.; JUNG, K. W. **Stress signaling pathways for the pathogenicity of *Cryptococcus***. *Euk. Cell.*, Coreia do Sul, v. 12, n. 12, p. 1564-77, 2013.
- BANERJEE, A.; SHANNON, K. M. **Leukemic transformation in patients with severe congenital neutropenia**. *J. Ped. Hem./Onc.*, v. 23, n. 8, p. 487-495, 2001.
- BANERJEE, P. et al. ***Cryptococcus laurentii* fungemia**. *J. Med. Microb.*, Índia, v. 31, n. 1, p. 75-77, 2013.
- BARNETT, J. A. **A history of research on yeasts 14: medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans***. *Med. Yeast*, Grã-Bretanha, v. 27, n. 11, p. 875-904, 2010.
- BARRY, A. L.; BROWN, S. D. **Fluconazole disk diffusion procedure for determining susceptibility of *Candida* species**. *J. Clin. Microbiol.*, v. 34, p. 2154-2157, 1996.
- BEETON, M. L. et al. **Assessing phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* using a *Galleria mellonella* infection model**. *Int J. Antimicrob. Ag.* v. 46, n. 2, p. 196-200, 2015.
- BENNETT, J. E. **Flucytosine**. *Ann. Intern. Med.*, v. 86, n. 3, p. 319-21, 1977.
- BERNAL-MARTINEZ, L., et al. **Susceptibility profile of clinical Isolates of non-*Cryptococcus neoformans*/non-*Cryptococcus gattii* *Cryptococcus* Species and Literature Review**. *Med. Mycol.*, Espanha, v. 48, n. 1, p. 90-96, 2010.
- BICANIC, T. et al. **High-dose amphotericin B with flucytosine for the treatment of cryptococcal meningitis in HIV-infected patients: a randomized trial**. *Clin. Inf. Dis.*, v. 47, n. 1, p. 123-30, 2008.
- BICANIC, T.; HARRISON T. S. **Cryptococcal meningitis**. *Br. Med. Bull.*, Londres, v. 18, n. 72, p. 99-118, 2005.
- BIELSKA, E.; MAY, R. C. **What makes *Cryptococcus gattii* a pathogen?** *FEMS Yeast Res.*, v. 16, n. 1, p. 106, 2016.
- BIZZINI, A.; GREUB, G. **Matrix-assisted laser desorption ionization time-offlight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification**. *Clin. Microbiol. Infect.* v. 16, n. 11, p. 1614-9, 2010.
- BOULWARE, D. R. et al. **Timing of antiretroviral therapy after diagnosis of cryptococcal meningitis**. *N. Engl. J. Med.*, Mineápolis, v. 370, n. 26, p. 2487-2498, 2014.
- BOVERS, M. et al. **Six monophyletic lineages identified within *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by multi-locus sequence typing**. *Fung. Genet. Biol.*, Holanda, v. 45, n. 4, p. 400-421, 2008.
- BRENNAN, M. et al. **Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae**. *FEMS Immun. Med. Microb.*, Irlanda, v. 34, n. 2, p. 153-157, 2002.
- BRILHANTE, R. S. N. et al. **An alternative method for the analysis of melanin production in *Cryptococcus neoformans sensu lato* and *Cryptococcus gattii sensu lato***. *Myc.*, Fortaleza, v. 17, p. 1-7, 2017.
- BROWN, G. D. et al. **Hidden killers: human fungal infections**. *Sci. Transl. Med.* v. 4, n. 165, 2012.
- BROWN, L. et al. **Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi**. *Nat. Rev. Microbiol.* Nova Iorque, v. 13, n. 10, p. 620-630, 2015.
- BUTLER, M. J.; DAY, A. W. **Fungal melanins: a review**. *Can. J. Microb.* v. 44, n. 12, p. 1115-1136, 1998.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- BYRNES, E. J. et al. **First reported case of *Cryptococcus gattii* in the Southeastern USA: implications for travel-associated acquisition of an emerging pathogen.** *PLoS One* v. 4, n. 6, p. e5851, 2009.
- CARDOSO, P. H. M. **Classificação e perfil fenotípico de cepas clínicas e ambientais do complexo *Cryptococcus neoformans* mantidas em banco de microrganismos.** Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo, 91 f. 2012.
- CARROLL, S. F.; GUILLOT, L.; QURESHI, S. T. **Mammalian model hosts of cryptococcal infection.** *Comp. Med.*, v. 57, n. 1, p. 9-17, 2007.
- CASADEVALL, A. et al. **Extensive allelic variation in *Cryptococcus neoformans*.** *J. Clin. Microb.*, Nova Iorque, v. 30, n. 5, p. 1080-1084, 1992b.
- CASADEVALL, A.; FAN, M. **URA5 gene of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: evidence for a close phylogenetic relationship between *C. neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans*.** *J. Gen. Appl. Microb.*, v. 38, n. 5, p. 491-495, 1992a.
- CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. ***Cryptococcus neoformans*.** Washington: ASM Press., p. 541, 1998.
- CASALI, A. K. et al. ***Cryptococcus neoformans*: Aspectos moleculares e epidemiológicos.** *Biotec. Ciênc. Desenv.*, n. 20, p. 34-37, 2001.
- CASSAGNE, C. et al. **Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry.** *PLoS One*, v. 6, n. 12, p. e28425, 2011.
- CASTELLÁ, G. ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. **Cryptococcosis y animales de compañía.** *Rev. Iberoam. Micol.*, v. 25, n. 8, p. 19-24, 2008.
- CHATURVEDI, S. et al. **Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* MAT α and MAT α pheromones to determine mating type, ploidy, and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies.** *J. Clin. Microb.*, v. 38, n. 5, p. 2007-2009, 2000.
- CHEN, A.; SOBEL, J. D. **Emerging azole antifungals.** *Expert. Opin. Emerg. Drugs.*, v. 10, n. 1, p. 21-23, 2005.
- CHEN, S. C.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. ***Cryptococcus gattii* infections.** *Clin. Microb. Rev.*, v. 27, n., p. 980-1024, 2014.
- CHEN, S. et al. **Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group.** *Clin. Infec. Dis.*, v. 31, n. 2, p. 499- 508, 2000.
- CHEN, Y. L. et al. **Calcineurin governs thermotolerance and virulence of *Cryptococcus gattii*.** *G3: Genes/Genomes/Genetics.*, v. 3, n. 3, p. 527-539, 2013.
- CHEONG, J. W.; MCCORMACK, J. **FLUe resistance in cryptococcal disease: emerging or intrinsic?** *Med. Mycol.*, v. 51, n. 3, p. 261-9, 2013.
- CHOWDHARY, A. et al., **A multicentre study of antifungal susceptibility patterns among 350 *Candida auris* isolates (2009–17) in India: role of the ERG11 and FKS1 genes in azole and echinocandin resistance.** *J. Antimicrob. Chem.*, v. 73, n. 4, p. 891-199, 2018.
- CLANCY, C. J. et al. ***Cryptococcus neoformans* var. *grubii* isolates recovered from persons with AIDS demonstrate a wide range of virulence during murine meningoencephalitis that correlates with the expression of certain virulence factors.** *Microb.*, Florida, v. 152, p. 2247-2255, 2006.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. CLSI document M27-A3, 2008.
- COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. **The intracellular life of *Cryptococcus neoformans*.** *Annu. Rev. Pathol.*, Nova Iorque, v. 14, n. 9, p. 219-38, 2014.
- COGLIATI, M. et al. **Fimua Cryptococcosis Network: Molecular epidemiology of Italian clinical *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* isolates.** *Med. Mycol.*, Itália, v. 51, n. 5, p. 499–506, 2013a.
- COGLIATI, M. **Global molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: an atlas of the molecular types.** *Sci.*, Itália, v. 13, p. 23, 2013b.
- COLOMBO, A. C.; RODRIGUES, M. L. **Fungal colonization of the brain: anatomopathological aspects of neurological cryptococcosis.** *Ann. Braz. Acad. Sci.*, Rio de Janeiro, v. 87, n. 2, p. 1293-1309, 2015.
- CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 41, n. 5, p. 524-544, 2008.
- COOK, S. M.; MCARTHUR, J. D. **Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens.** *Virulence.* *Vir.*, Austrália, v. 4, n. 5, p. 350-3, 2013.
- CORREA, M. P. et al. **Cryptococcosis in children in the State of Pará, Brazil.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Pará, v. 32, n. 5, p. 505-508, 1999.
- DA SILVA, E. C., et al. ***Cryptococcus gattii* molecular type VGII infection associated with lung disease in a goat.** *BMC Vet. Res.*, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 41, 2017.
- DA SILVA, P. R.; et al. **Suscetibilidade a antifúngicos de variedades de *Cryptococcus neoformans* isoladas de pacientes em hospital universitário.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.41, n. 2, p. 158-162, 2008.
- DA SILVA, T. A. et al. **Extracellular vesicles from *Paracoccidioides brasiliensis* induced M1 polarization in vitro.** *Ribeirão Preto, Sci. Rep.*, v. 16, n. 6, p. 35867, 2016.
- DANESI, P. et al. **Multilocus sequence typing (MLST) and *M*₁₃ PCR fingerprinting revealed heterogeneity amongst *Cryptococcus* species obtained from Italian veterinary isolates.** *FEMS Yeast Res.*, Itália, v. 14, n. 6, p. 897-909, 2014.
- DE JESUS, M. et al. **Capsular localization of the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide componente galactoxylomannan.** *Eukar. Cell.*, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1, p. 96-103, 2009.
- DE JESUS, M., et al. **Galactoxylomannan does not exhibit cross-reactivity in the platelia *Aspergillus* enzyme immunoassay.** *Clin Vaccine Immunol.* *Clin. Vaccin. Immunol.*, Indianápolis, v. 14, n. 5, p. 624-7, 2007.
- DE JONG, Y. et al. **Fauna Europaea – all European animal species on the web.** *Biod. Dat. J.*, Europa, v. 2, p. e4034, 2014.
- DEL PETA, M.; CASADEVALL, A. **Tem challenges on *Cryptococcus* and cryptococcosis.** *Mycop.*, v. 173, n. 0, p. 303-310, 2012.
- DESALERMOS, A.; KOURKOUNPETIS, T. K.; MYLONAKIS, E. **Update on the epidemiology and management of cryptococcal meningitis.** *Exp. Opin Pharm.*, v. 13, n.6, p. 783-9, 2012.
- DESNOS-OLLIVIER, M. et al. **Cryptococcosis Serotypes Impact Outcome and Provide Evidence of *Cryptococcus neoformans* Speciation.** *MBio*, França, v. 6, n. 3, p. e00311-15, 2015.
- DIAS, A. L. T. et al. **Comparative analysis of Etest and broth microdilution method (AFST-EUCAST) for trends in antifungal drug susceptibility testing of Brazilian *Cryptococcus neoformans* isolates.** *J. Med. Mic.*, São Paulo, v. 55, p. 1693-1699, 2006.
- DISMUKES, W.E. **Management of cryptococcosis.** *Clin. Infect. Dis.*, v. 17, n. 2, p. S507-12, 1993.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- DROMER, F. et al. **Epidemiology of HIV-associated cryptococcosis in France (1985-2001): comparison of the pre- and post-HAART eras.** *AIDS*, v. 18, n. 3, p. 555-62, 2004.
- DUNPHY, G. B. et al. **Virulence of *Candida albicans* mutants toward larval *Galleria mellonella* (Insecta, Lepidoptera, Galleridae).** *Can. J. Microbiol.*, Canadá, v. 49, p. 514-524, 2003.
- EISENMAN, H. C.; CASADEVALL, A. **Synthesis and assembly of fungal melanin.** *Appl Microb. Biotec.*, v. 93, n. 3, p. 931-40, 2012.
- ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. **Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*.** *J. Clin. Microb.*, Austrália, v. 28, n. 7, p. 1642-1644, 1990.
- ENACHE-ANGOULVANT, A. et al. **Molecular identification of *Cryptococcus neoformans* serotypes.** *J. Clin. Microb.*, Paris, v. 45, n. 4, p. 1261-1265, 2007.
- 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.** *Antim. Ag. Chem.*, v. 56, n. 6, p. 3107-13, 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 FLUe, ITRe, posaconazole, and VORe.** *Antim. Ag. Chem.*, v. 56, n. 11, p. 5898-5906, 2012b.
- ESPINEL-INGROFF, A.; KIDD, S. E. **Current trends in the prevalence of *Cryptococcus gattii* in the United States and Canada.** *Infec. Drug. Res.*, Austrália, v. 11, n. 8, p. 89-97, 2015.
- FARIA, G. O. et al. **Características *in vitro* de isolados do complexo *Cryptococcus laurentii* em diferentes meios de cultura.** *Rev. Patol. Trop.* v. 43, n. 3, 290-302. jul.-set. 2014.
- FARRER, R. A. et al. **Microevolutionary traits and comparative population genomics of the emerging pathogenic fungus *Cryptococcus gattii*.** *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, v. 371, n. 371, p. 1709, 2016.
- FAVALESSA, O. C. et al. **Molecular typing and *in vitro* antifungal susceptibility of *Cryptococcus* spp. from patients in Midwest Brazil.** *J. Inf. Dev. Ctries.*, v. 8, n. 8, p. 1037-43, 2014.
- FELDMESSER, M.; KRESS, Y.; CASADEVALL, A. **Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonar infection.** *Microb.* 2001; v. 147, p. 2355-2365, 2001.
- FELL, J. W. et al. **Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis.** *Int. J. Syst. Evol. Microb.*, v. 50, n. 3, p. 1351-71, 2000.
- FENG, X. et al. **Simultaneous identification of molecular and mating types within the *Cryptococcus* species complex by PCR-RFLP analysis.** *J. Med. Microb.*, v. 57, n. 12, p. 1481-1490, 2008.
- FERREIRA-PAIM, K. et al. **Genotyping of *Cryptococcus neoformans* isolated from captive birds in Uberaba, Minas Gerais, Brazil.** *Myc.*, v. 54, n. 5, p. e294-300, 2011.
- FERREIRA-PAIM, K. et al. **MLST-Based Population Genetic Analysis in a Global Context Reveals Clonality amongst *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI Isolates from HIV Patients in Southeastern Brazil.** *PLoS. Negl. Trop. Dis.*, v. 11, n. 1, p. e0005223, 2017.
- FERREIRA-PAIM, K. et al. **Phylogenetic Analysis of Phenotypically Characterized *Cryptococcus laurentii* Isolates Reveals High Frequency of Cryptic Species.** *PLoS. One.*, Minas Gerais, v. 9, n. 9, p. e108633, 2014.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- FILION, T.; KIDD, S.; AGUIRRE, K. **Isolation of *Cryptococcus laurentii* from Canada Goose guano in rural upstate New York.** *Mycop.*, Canadá, v. 162, n. 5, p. 363-8, 2006.
- FIRACATIVE, C.; DUAN, S.; MEYER, W. ***Galleria mellonella* model identifies highly virulent strains among all major molecular types of *Cryptococcus gattii*.** *PLoS One.*, Austrália, v. 9, n. 8, p. e105076, 2014.
- FRANÇA, J. S. **Características clínicas, epidemiológicas e laboratoriais da criptococose no Distrito Federal no Período de 2006 a 2013.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Brasília, 112 f., 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.** *Myc.*, v. 55, n. 3, p. 145-50, 2012.
- FRIESE, G. et al. **Development of azole resistance during FLUe maintenance therapy for AIDS-associated cryptococcal disease.** *Aids.*, v. 15, n. 17, p. 2344-2345, 2001.
- FUCHS, B. B. et al. **Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis.** *Vir.*, v. 1, n. 6, p. 475-82, 2017.
- GARCIA-RIVERA, J. et al. ***Cryptococcus neoformans* CAP59 (or Cap59p) is involved in the extracellular trafficking of capsular glucuronoxylomannan.** *Euk. Cell.*, v. 3, n. 8, p. 385-392, 2004.
- GARCIA-RODAS, R. et al. ***Cryptococcus neoformans* capsular enlargement and cellular gigantism during *Galleria mellonella* infection.** *PLoS One.*, v. 6, n. 9, p. e24485, 2011.
- GARCIA-SOLACHE, M. A. et al. **Fungal virulence in a lepidopteran model is an emergent property with deterministic features.** *MBio.*, Nova Iorque, v. 4, n. 3, p. e00100–13, 2013.
- GAZZONI, A. F. et al. **Histopathology, serology and cultures in the diagnosis of cryptococcosis.** *Rev. Inst. Med. Trop.*, São Paulo, v. 51, n. 5, p. 255-259, 2009.
- GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. **Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance.** *Clin. Microb. Rev.*, v. 12, p. 501-517, 1999.
- GOLD, N. et al. **Amphotericin A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. In vitro studies.** *Antib. Annu.*, v. 3, p. 579-86, 1956.
- GOLDMAN, D. L. et al. ***Cryptococcus neoformans* meningitis in the rat.** *Lab. Invest.*, v. 75, n. 6, p. 759-70, 1996.
- GOLDMAN, D.; LEE, S.C.; CASADEVALL, A. **Pathogenesis of pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection in the rat.** *Infect. Immun.*, Nova Iorque, v. 62, n. 11, 4755-4761, 1994.
- GUPTA, M.; MISHRA, A. K.; SINGH, S. K. ***Cryptococcus laurentii* fungemia in a low birth weight preterm neonate: India.** *J. Infect. Public. Health.*, v. 11, n.6, p. 896–897, 2018.
- HAGEN, F. et al. **Molecular epidemiology and in vitro antifungal susceptibility testing of 108 clinical *Cryptococcus neoformans sensu lato* and *Cryptococcus gattii sensu lato* isolates from Denmark.** *Myc.* v. 59, n. 9, p. 576-84, 2016.
- HAGEN, F. et al. **Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex.** *Fung. Genet. and Biol.*, Orlando, v. 78, n.1, p. 16-48, 2015.
- HEITMAN, J. et al. ***Cryptococcus*: from human pathogen to model yeast.** ASM Press., Washington, v. 11, n. 6, p. 434, 2011.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- HERKERT, P. F. et al. **Molecular characterizatón and antifungal susceptibility of clinical *Cryptococcus deuterogattii* (AFLP6/VGII) isolates from Southern Brazil.** *Eur. J. Clin. Microb. Infect. Dis.*, Curitiba, v. 35, n. 11, p. 1803–1810, 2016.
- HERKERT, P. F. et al. **Molecular characterizatón and antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans sensu stricto* from Southern Brazil.** *J. Med. Microb.*, Curitiba, v. 67, n. 4, p. 560-569, 2018.
- HERNÁNDEZ, I. C. V. et al. **Pigmentación de cepas de *Cryptococcus neoformans* sobre agar semilla de girassol.** *Rev. Cub. Med. Trop.*, v. 55, p. 119-120, 2003.
- HETTICK, J. M. et al. **Discrimination of Fungi by MALDI-TOF Mass Spectrometry.** *Amer. Chem. Soc.*, Washington, v. 1065, p. 35-50, 2011.
- HOLLOMON, D. **Does agricultural use of azole fungicides contribute to resistance in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*?** *Pert. Manag. Sci.*, v. 73, p. 1987-1993, 2017.
- HORNSEY, M. et al. **In vivo efficacy of telavancin/colistin combination therapy in a *Galleria mellonella* model of *Acinetobacter baumannii* infection.** *Int. J. Antimicrob. Agents.*, v. 41, n. 3, p. 285-87, 2013.
- HULL, C. M.; DAVIDSON, R. C.; HEITMAN, J. **Cell identity and sexual development in *Cryptococcus neoformans* are controlled by the mating-type specific homeodomain protein *Sxi1α*.** *Genes. Dev.*, Carolina do Norte, v. 16, n. 23, p. 3046-60, 2002.
- IKEDA, R. et al. **Laccase and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*.** *J. Clin. Microb.*, Tóquio, v. 40, n. 4, p. 1214-1218, 2002.
- ILLNAIT-ZARAGOZI, M. T. **Microsatellite typing and susceptibilities of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from Cuban patients with recurrent meningitis.** *BMC Infect. Dis.*, Holanda, v. 4, n. 10, p. 289, 2010.
- ITO-KUWA, S. et al. **Diversity of laccase among *Cryptococcus neoformans* serotypes.** *Microb. Immun.*, v. 52, n. 10, p. 492-498, 2008.
- JACKSON, J. C.; HIGGINS, L. A.; LIN, X. **Conidiation color mutants of *Aspergillus fumigatus* are highly pathogenic to the heterologous insect host *Galleria mellonella*.** *PLoS One.*, Texas, v. 4, n. 1, p. e4224, 2009.
- JACOBSON, E. S.; HOVE, E.; EMERY, H. S. **Antioxidant function of melanin in black fungi.** *Infect Immun.*, v. 63, n. 12, p. 4944-4945, 1995.
- JOHNSON, L. B.; BRADLEY, S. F.; KAUFFMAN, C. A. **Fungaemia due to *Cryptococcus laurentii* and a review of non-neoformans cryptococcaemia.** *Myc.*, Berlin, v. 41, n. 7-8, p. 277-280, 1998.
- JÚNIOR, J. A. C. **Caracterização dos isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. e determinação de sua sensibilidade à antifúngicos e ao extrato de *Eugenia dysenterica*.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de Brasília, 71 f., 2016.
- KAVANAGH, K.; REEVES, E. P. **Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens.** *FEMS Microb. Rev.*, Irlanda, v. 28, n. 1, p. 101-112, 2004.
- KELLY, S.L. et al. **Resistance to amphotericin B associate with defective sterol delta 8 -->7 isomerase in a *Cryptococcus neoformans* strain from an AIDS patient.** *FEMS Microb. Lett.*, v. 122, n. 1-2, p. 39-42, 1994.
- KHAWCHAROENPORN, T.; APISARNTHANARAK, A.; MUNDY, L. M. **Non-neoformans cryptococcal infections: a systematic review.** *Infec.*, v. 35, n. 2, p. 51-58, 2007.
- KIDD, S. E. et al. **Descriptions of medical fungi**, Austrália, 2016.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- KIERTIBURANAKUL, S.; SUNGKANUPARPH, S.; PRACHARKTAM, R. ***Cryptococcus laurentii fungemia: A case report***. *J. Infect. Dis. Antimicrob. Age.*, v. 18, n. 3, p. 112–114, 2001.
- KNOLLMAN, B. C. **Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. Amgh., Brasil, 2012.
- KÖLJALG, U. et al. ***Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi***. *Mol. Ecol.*, v. 22, n. 21, p. 5271-7, 2013.
- KRONSTAD, J. W. et al. ***Expanding fungal pathogenesis: Cryptococcus breaks out of the opportunistic box***. *Nat. Rev. Microbiol.* v. 9, n. 3, p. 193-203, 2011.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. **MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets**. *Mol. Biol. Evol.*, v. 33, n. 7, p. 1870-4, 2016.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. ***The yeasts: a taxonomic study***. ACM Press., Nova Iorque, 2011.
- KWON-CHUNG, K. J. ***A new genus, filobasidiella, the perfect state of Cryptococcus neoformans***. *Mycolog.*, v. 67, n. 6, p. 1197-200, 1975.
- KWON-CHUNG, K. J. et al. ***Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii, the etiologic agents of cryptococcosis***. *Cold Spring Harb. Persp. Med.* V. 4, n. 7, p. a019760, 2014.
- KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. ***Cryptococcosis***. In KJ Kwon- Chung, JE Bennett (eds.), *Medical Mycology*, Philadelphia, p. 397-446, 1992.
- KWON-CHUNG, K. J.; RHODES, J. C. ***Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in Cryptococcus neoformans***. *Infect. Immun.* v. 51, n. 1, p. 218-223, 1986.
- KWON-CHUNG, K. J.; VARMA, A. ***Do major species concepts support one, two or more species within Cryptococcus neoformans?*** *FEMS Yeast Res.* v. 6, n. 4, p. 574-87, 2006.
- LACAZ, C. S. et al. **Tratado de micologia médica**. Sarvier., São Paulo, 2002.
- LÁZERA, M. S. et al. **Criptococose** In: Coura, José Rodrigues. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Guan. Koog., Rio de Janeiro, v. 2, n. 1, p. 1223-1235, 2005.
- LÁZERA, M. S.; IGREJA, R. P.; WANKE, B. **Micologia médica**. Guan. Koog., Rio de Janeiro, 2004.
- LEE, S. J. et al. ***Cryptococcal meningitis in patients with or without Human immunodeficiency virus: experience in a tertiary Hospital***. *Yonsei. Med. J.*, v. 52, n. 3, p. 482-7, 2011.
- LEVITZ, S.M. ***The ecology of Cryptococcus neoformans and the epidemiology of cryptococcosis***. *Reviews of Infectious Diseases*, v.13, n.6, p.1163-1169, 1991.
- LEVITZ, S. M.; BOEKHOUT, T. ***Cryptococcus: the once-sleeping giant is fully awake***. *FEMS Yeast Res.*, v. 6, n. 4, p. 461-2, 2006.
- LI, M. et al. ***Antifungal susceptibilities of Cryptococcus species complex isolates from AIDS and non-AIDS patients in Southeast China***. *Braz. J. Infect. Dis.* v. 16, n. 2, p. 175-9, 2012.
- LI, S. S.; MODY, C. H. ***Cryptococcus***. *Proc Am Thorac Soc.* v. 7, n. 3, p. 186-96, 2010.
- LIAN, S. J.; WU, H. C.; HSUEH, P. R. ***Microbiological characteristics of clinical isolates of Cryptococcus neoformans in Taiwan - serotypes, mating types, molecular types, virulence factors, and antifungal susceptibility***. *Clin. Microb. Inf.*, v. 16, n. 6, p. 696-703, 2009.
- LIMA, F. R. **Espécies de Cryptococcus obtidas de isolados clínicos e ambientais da cidade de Campinas, SP: genotipagem e avaliação da suscetibilidade “in vitro” frente a agentes**

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- antifúngicos isolados e em diferentes combinações** Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, [s.n.], 2014.
- LIN, X. et al. **Impact of mating type, serotype, and ploidy on the virulence of *Cryptococcus neoformans***. *Inf. Immun.*, v. 76, n. 7, p. 2923-2938, 2008.
- LIN, X.; HEITMAN, J. **The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex**. *Ann. Rev. Microb.*, v. 60, n. 1, p. 69-105, 2006.
- LINNAEUS, C. **Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis**. Salvius., 1758.
- LIONAKIS, M. S.; LEVITZ, S. M. **Host control of fungal infections: lessons from basic studies and human cohorts**. *Annu. Rev. Immunol.* v. 36, p. 157-191, 2018.
- LITVINTSEVA, A. P. et al. **Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana**. *Genetics.*, v.172, , n. 4, p. 2223-38, 2005.
- LIU, X. Z. et al. **Phylogeny of tremellomycetous yeasts and related dimorphic and filamentous basidiomycetes reconstructed from multiple gene sequence analyses**. *Stud. Mycol., China*, v. 81, p. 1-29, 2015a.
- LIU, X. Z. et al. **Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes**. *Stud. Mycol., China*, v. 81, p. 85-147, 2015b.
- 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, 2013.
- LOCKHART, S. R.; MCCOTTER, O. Z.; CHILLER, T. M. **Emerging fungal infections in the Pacific Northwest: the unrecognized burden and geographic range of *Cryptococcus gattii* and *Coccidioides immitis***. *Microbiol. Spectr.*, v. 4, n. 3, 2016.
- LOYSE, A. et al. **Flucytosine and cryptococcosis: time to urgently address the worldwide accessibility of a 50-year-old antifungal**. *J. Antim. Chem.*, v. 68, n. 11, p. 2435–2444, 2013.
- MAGALHÃES, Y. C. et al. **Clinical significance of the isolation of *Candida* species from hospitalized patients**. *Braz. J. Microbiol.*, v. 46, n. 1, p. 117-23, 2015.
- MANFREDI, R. et al. **Emergence of amphotericin B-resistant *Cryptococcus laurentii* meningoencephalitis shortly after treatment for *Cryptococcus neoformans* meningitis in a patient with AIDS**. *AIDS Patient Care STDS.*, v. 20, n. 4, p. 227-32, 2006.
- MARRA, R. E. et al. **A genetic linkage map of *Cryptococcus neoformans* variety *neoformans* serotype D (*Filobasidiella neoformans*)**. *Genetics.*, v. 167, n. 2, p. 619-631, 2004.
- MARTINEZ, L. R.; GARCIA-RIVERA, J.; CASADEVALL, A. ***Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) strains are more susceptible to heat than *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A) strains**. *J. Clin. Microbol.*, v. 39, n. 9, p. 3365-7, 2001.
- MARTINS, L. M. et al. **Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piauí (northeastern Brazil)**. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, Belo Horizonte, v. 106, n. 6, p. 725–730, 2011.
- MATOS, C. S. et al. **Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus* spp. in Bahia, Brazil: molecular types and antifungal susceptibilities**. *Eur. J. Clin. Microb. Infec. Dis.*, Salvador, v. 31, n. 7, p. 1647-1652, 2012.
- MCCLELLAND, E. E.; BERNHARDT, P.; CASADEVALL, A. **Coping with multiple virulence factors: which is most important?** *PLoS Pathog.* v. 1, n. 4, p. e40, 2005.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- MCCULLOH, R. J. et al. ***Cryptococcus gattii* genotype VGI infection in New England**. *Pediat. Infect. Dis. J.*, v. 30, n. 12, p. 1111–1114, 2011.
- MCCURDY, M. D.; MORROW, J. D. ***Ventriculitis due to Cryptococcus uniguttulatus***. *South. Med. J.*, v. 94, n. 1, p. 65-66, 2001.
- MENEZES, R. P.; PENATTI, M. P. A.; PEDROSO, R. S. ***Different culture media containing methyldopa for melanin production by Cryptococcus species***. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 44, n. 5, p. 591-594, 2011.
- MEYER, W. et al. ***Molecular typing of Iberoamerican Cryptococcus neoformans isolates***. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 9, n. 2, p. 189-195, 2003.
- MEYER, W.; TRILLES, L. **Fourth international course in Molecular Methodologies for Epidemiology and Diagnosis of Systemic Mycoses**. FIOCRUZ-RJ, 2016.
- MEYER, W.; TRILLES, L. ***Genotyping of the Cryptococcus neoformans/C. gattii species complex***. *Aust. Bioc.*, v. 41, n. 1, p. 11-15, 2010.
- MEZZARI, A. et al. ***Criptococose em um hospital público de Porto Alegre: dados epidemiológicos***. *J. Infect. Control.*, Porto Alegre, v. 2, n. 3, p. 135-139, 2013.
- MILLOGO A. et al. ***Cryptococcal meningitis in HIV-infected patients at BoboDioulasso hospital (Burkina Faso)***. *Bull Soc. Pathol. Exot.*, v. 97, n. 2, p. 119–21, 2004.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde do Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação geral de doenças transmissíveis, unidade de vigilância das doenças de transmissão respiratória e imunopreveníveis. **Vigilância e Epidemiológica da Criptococose**. Brasília, 2012.
- MIRZA, S. et al. ***The changing epidemiology of cryptococcosis: An update from population based active surveillance in 2 large metropolitan areas, 1992-2000***. *Clin. Infect. Dis.*, v. 36, n. 6, p. 789-94, 2003.
- MITCHELL, A. P. ***Updated view of Cryptococcus neoformans mating type and virulence***. *Inf. Immun.*, Washington, v. 71, n. 9, p. 4829-4830, 2003.
- MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. ***Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after the discovery of Cryptococcus neoformans***. *Clin. Microb. Rev.*, v. 8, n. 4, p. 515-548, 1995.
- MONARI, C.; BISTONI, F.; VECCHIARELLI, A. ***Glucuronoxylomannan exhibits potent immunosuppressive properties***. *FEMS Yeast Res.*, v. 6, n. 4, p. 537-42, 2006.
- MORA, D. J. et al. ***Clinical, epidemiological and outcome features of patients with cryptococcosis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil***. *Mycopat.*, v. 173, n. 5-6, p. 321-7, 2012.
- MORA, D. J. et al. ***Genotype and mating type distribution within clinical Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii isolados from patients with cryptococcal meningitis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil***. *Med. Mycol.*, Londres, v. 48, n. 4, p. 561-569, Jun. 2010.
- MORACE, G.; PERDONI, F.; BORGHI, E. ***Antifungal drug resistance in Candida species***. *J. Glob. Antim. Resist.*, v. 2, n. 4, p. 254-259, 2014.
- MORALES, B. P. ***Suscetibilidade in vitro de Cryptococcus neoformans e Cryptococcus gattii frente a drogas antifúngicas pela citometria de fluxo***. Dissertação (Mestrado). Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 49f., 2009.
- MOREIRA, T. A. et al. ***Criptococose: estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes***. *Ver. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 39, n. 3, p. 255-258, 2006.
- MPOZA, E.; RHEIN, J.; ABASSI, M. ***Emerging FLUe resistance: Implications for the management of cryptococcal meningitis***. *Med. Myc. Cas. Reports.*, v. 19, p. 30-32, 2018.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- MYLONAKIS, E. et al. **Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis.** *Proc Natl Acad Sci USA.*, v. 99, n. 24, p. 15675-80, 2002.
- MYLONAKIS, E. et al. ***Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis.** *Infect Immun.*, v. 73, n. 7, p. 3842-50, 2005.
- NANDHAKUMAR, B. et al. **Mustard Seed Agar, a new medium for differentiation of *Cryptococcus neoformans*.** *J. Clin. Microb.*, v. 44, n. 2, p. 674, 2006.
- NASCIMENTO, E. et al. ***Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* isolates from both HIV-infected and uninfected patients: antifungal susceptibility and outcome of cryptococcal disease.** *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.*, Ribeirão Preto, v. 59, p. 49, 2017.
- NASCIMENTO, E. et al. **Primary cutaneous cryptococcosis in an immunocompetent patient due to *Cryptococcus gattii* molecular type VGI in Brazil: a case report and review of literature.** *Myc.*, Ribeirão Preto, v. 57, n. 7, p. 442– 447, 2014.
- NASCIMENTO, E. et al. **Refractory and/or Relapsing Cryptococcosis Associated with Acquired Immune Deficiency Syndrome: Clinical Features, Genotype, and Virulence Factors of *Cryptococcus* spp. Isolates.** *Am. J. Trop. Hyg.*, Ribeirão Preto, v. 94, n. 5, p. 975-981, 2016.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI): **Nucleotide BLAST (BLASTn): Search nucleotide databases using a nucleotide.** Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch>. Acesso em: 19 fev. 2019.
- NEVILLE, S. A. et al. **Utility of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry following introduction for routine laboratory bacterial identification.** *J. Clin. Microbiol.* v. 49, n. 8, p. 2980-4, 2011.
- NGAMSKULRUNGROJ, P.; MEYER, W. **Melanin production at 37°C is linked to the high virulent *Cryptococcus gattii* Vancouver Island outbreak genotype VGIIa** *Austral. Myc.*, v. 28, p. 9-15, 2009.
- NGUYEN, M. H. et al. **Do in vitro susceptibility data predict microbiologic response to amphotericin B? Results of a prospective study of patients with *Candida* fungemia.** *J. Infect. Dis.*, v. 177, n. 2, p. 425-430, 1998.
- NOGUERA, M. C.; ESCANDON, P.; CASTANEDA, E. **Fatal *Cryptococcus gattii* genotype VGI infection in an HIV-positive patient in Barranquilla, Colombia.** *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.*, Colômbia, v. 59, p. 1-5, 2017.
- NOSANCHUK, J.D.; STARK, R. E.; CASADEVALL, A. **Fungal melanin: what do we know about structure?** *Front. Microbiol.*, v. 6, p. 1463, 2015.
- NUNES, T. J. C. **Identificação molecular de sorotipos e determinação de mating type de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Bahia, Salvador, 68 f., 2013.
- NYAZIKA, T. K. et al. ***Cryptococcus tetragattii* as a major cause of cryptococcal meningitis among HIV-infected individuals in Harare, Zimbabwe.** *J. Infect.*, v. 72, n. 6, p. 745-752, 2016.
- O'MEARA, T. R.; ALSPAUGH, J. A. **The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield.** *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 25, n. 3, p. 387-408, 2012.
- OKABAYASHI, K. et al. **Serotypes and mating types of clinical from feline cryptococcosis in Japan.** *J. Vet. Med. Sci.*, Tóquio, v. 68, n. 1, p. 91-94, 2006.
- OLIVEIRA, D. L. et al. **Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions.** *Infect. Immun.*, v. 78, n. 4, p. 1601-9, 2010.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- OLIVEIRA, M. T. B. et al. ***Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil.** *J. Clin. Microbiol.*, p. 1356-1359, 2004.
- ORMEROD, K. L. et al. ***Comparative genomics of serial isolates of Cryptococcus neoformans reveal gene associated with carbon utilization and virulence.*** *G3 (Bethesda)*, v. 3, n. 4, p. 675-686, 2013.
- PALLISTER, C. J.; WARNOCK, D. W. ***Effect of antimicrobial and antineoplastic drugs alone and in combination on the phagocytic and candidacidal function of human polymorphonuclear leucocytes.*** *J. Ant. Chemot.*, v. 23, n. 1, p. 87-94, 1989.
- PAPPALARDO, M. C. S. M.; MELHEM, M. S. C. ***Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease.*** *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.*, v. 45, n. 6, p. 299-305, 2003.
- PAPPALARDO, M. C. S. M.; PASCHOAL, R. C.; MELHEM, M. S. C. ***AIDS-associated central nervous system cryptococcosis: a Brazilian case study.*** *AIDS.*, v.21, n. 14, p. 1971-1983, 2007.
- PAPPAS, P. G. et al. ***Invasive fungal infections among organ transplant recipients: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET).*** *Clin Infect. Dis.*, v. 50, n. 8, p. 1101-11, 2010.
- 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. 525-30, 2009.
- PASA, C. R. ***Tipagem molecular e suscetibilidade antifúngica de Cryptococcus isolados de pacientes em Hospital Universitário com investigação domiciliar.*** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2011.
- PASQUALOTTO, A. C. et al. ***Cryptococcemia. An analysis of 28 cases with emphasis on the clinical outcome and its etiologic agent.*** *Rev. Iberoam. Micol.*, v.21, n. 3, p. 143-6, 2004.
- PATTERSON, T. F. ***Advances and challenges in management of invasive mycoses.*** *Lancet.*, v. 366,, n. 9490, p. 1013-25, 2005.
- PAUGAM, A. et al. ***Increased FLUe resistance of Cryptococcus neoformans isolated from a patient with AIDS and recurrent meningitis.*** *Clin. Infect. Dis.*, v. 19, n. 5, p. 975-976, 1994.
- PEARSON, W. R.; LIPMAN, D. J. ***Improved tools for biological sequence comparison.*** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 85, n. 8, p. 2444-8, 1988.
- PEDROSO, R. S. et al. ***Cryptococcus neoformans var. grubii – Pathogenicity of environmental isolates correlated to virulence factors, susceptibility to FLUe and molecular profile.*** *Mem. Inst. Osw. Cruz.*, v. 105, n. 8, p. 993-1000, 2010a.
- PEDROSO, R. S. et al. ***Evaluation of melanin production by Cryptococcus species in four different culture media.*** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* V. 40, n. 5, p. 566-568, 2007.
- PEDROSO, R. S. et al. ***Infecções Causadas por Cryptococcus albidus e C. laurentii: implicações clínicas e identificação laboratorial.*** *News Lab.*, v. 17, n. 102, p. 96-104, 2010b.
- PEDROSO, R. S.; CANDIDO, R. C. ***Diagnóstico laboratorial da criptococose.*** *News Lab.*, v. 14, p. 94-102, 2006.
- PERFECT, J. R. et al. ***Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of America.*** *Clin. Inf. Dis.*, Chicago, v. 50, n. 3, p. 291-332, 2010.
- PERFECT, J. R.; COX, G. M. ***Drug resistance in Cryptococcus neoformans.*** *Drug. Resist. Updat.*, v. 2, n. 4, p. 259-269, 1999.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- PERICOLINI, E. et al. ***Cryptococcus neoformans capsular polysaccharide component galactoxylomannan induces apoptosis of human T-cells through activation of caspase-8.*** *Cell. Microb.*, v. 8, n. 2, p. 267-75, 2006.
- PFALLER, M. A. et al. ***Antifungal susceptibilities of Candida, Cryptococcus neoformans and Aspergillus fumigatus from the Asia and Western Pacific region: data from the SENTRY antifungal surveillance program (2010-2012).*** *J. Antibiot. (Tokyo)*, v. 68, n. 9, p. 556-61, 2015.
- PFALLER, M. A. et al. ***Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for Candida spp., Cryptococcus neoformans, and Aspergillus fumigatus: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiologic cutoff values to characterize resistance in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2009).*** *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 69, n. 1, p. 45-50, 2011.
- PFALLER, M. A. et al. ***Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic and temporal trends of antifungal resistance.*** *J. Clin. Microbiol.*, v. 51, n. 8, p. 2571-2581, 2013.
- PFALLER, M. A. et al. ***Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: 10.5-year analysis of susceptibilities of noncandidal yeast species to FLUe and VORe determined by CLSI standardized disk diffusion testing.*** *J. Clin. Microbiol.*, v. 47, n. 1, p. 117-123, 2009.
- QUEIROZ, J. P. A. F. et al. ***Criptococose: Uma revisão bibliográfica.*** v. 2, n. 2, p. 32-38, 2008.
- RAJASINGHAM, R. et al. ***Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis.*** *Lancet. Infect. Dis.*, v. 17, n. 8, p. 873-881, 2017.
- RODRIGUES, M. L. et al. ***Extracellular vesicles produced by Cryptococcus neoformans contain protein components associated with virulence.*** *Eukaryot. Cell.*, v. 7, n. 1, p. 58-67, 2008.
- ROSAS, A. L. et al. ***Isolation and serological analyses of fungal melanins.*** *J. Imm. Methods.*, v. 244, n. 1-2, p. 69-80, 2000.
- SAAG, M. S. et al. ***Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Infectious diseases society of America.*** *Clin. Infect. Dis.*, v. 30, n. 4, p. 710-8, 2000.
- SABIITI, W. et al. ***Efficient phagocytosis and laccase activity affect the outcome of HIV-associated cryptococcosis.*** *J. Clin. Invest.*, v. 124, n. 5, p. 2000-8, 2014.
- SABIITI, W.; MAY, R. C.; PURSALL, E. R. ***Experimental models of cryptococcosis.*** *Int. J. Microbiol.*, v. 2012, p. 10, 2012.
- SAHA, D. C., et al. ***Detection of Cryptococcus by conventional, serological and molecular methods.*** *J. Med. Microb.*, v. 58, p. 1098-1105, 2009.
- SAIJO, T. et al. ***Anti-granulocyte-macrophage colony-stimulating factor autoantibodies are a risk factor for central nervous system infection by Cryptococcus gattii in otherwise immunocompetent patients.*** *MBio.*, v. 5, n. 2, p. e00912-14, 2014.
- SANTOS, C. et al. ***Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.*** *J. Appl. Microbiol.*, v. 108, n. 2, p. 375-85, 2010.
- SANTOS, W. R. A. et al. ***Primary endemic Cryptococcosis gattii by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil.*** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v. 103, n. 8, p. 813-818, 2008.
- SCHIAVE, L. A. et al. ***Variability in UVB tolerances of melanized and non melanized cells of Cryptococcus neoformans and C. laurentii.*** *Photoc. Photob.*, v. 85, p. 205-213, 2009.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- SCHOCH, C. L. et al. **Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012.
- SCORZONI, L. et al. **Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in nonconventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile.** *PLoS One.*, v. 8, n. 3, p. e60047, 2013.
- SHANKAR, E. M. et al. **Pneumonia and pleural effusion due to *Cryptococcus laurentii* in a clinically proven case of AIDS.** *Can. Respir. J.*, v. 13, n. 5, p. 275-8, 2006.
- SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Medica**, 1999.
- SIDRIM, J. J. et al. **Molecular methods for the diagnosis and characterization of *Cryptococcus*: a review.** *Can. J. Microb.*, v. 56, n. 6, p. 445-58, 2010.
- SILVA, D. C. et al. **Susceptibility to antifungal agents and genotypes of Brazilian clinical and environmental *Cryptococcus gattii* strains.** *Diag. Microb. and Inf. Dis.*, v. 72, n. 4, p. 332-9, 2012.
- SLOAN, D. J.; PARRIS, V. ***Cryptococcal meningitis: epidemiology and therapeutic options.*** *Clin. Epidemiol.*, v. 6, p. 169-82, 2014.
- SMITH, K. D. et al. **Increased antifungal drug resistance in clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* in Uganda.** *Antimicrob. Ag. Chem.*, v. 59, n. 12, p. 7197-204, 2015.
- SORRELL, T. C. ***Cryptococcus neoformans* variety *gattii*.** *Med. Mycol.*, v. 39, n. 2, p. 155-68, 2001.
- SOUTO, A. C. 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. Negl. Trop. Dis.*, v. 10, n. 8, p. 1-19, 2016.
- SOUZA, L. K. H. et al. **Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* species complex isolates in Goiania, Brazil.** *Myc.*, v. 53, n. 1, p. 62-7, 2009.
- SPRINGER, D. J.; CHATURVEDI, V. **Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*.** *Emerg. Infec. Dis.*, v. 16, n. 1, p. 14-20, 2010.
- SRICHATRAPIMUK, S.; SUNGKANUPARPH, S. **Integrated therapy for HIV and cryptococcosis.** *AIDS Res. Ther.*, 2016.
- SRIKANTA, D.; SANTIAGO-TIRADO, F. H.; DOERING, T. L. ***Cryptococcus neoformans*: Historical curiosity to modern pathogen.** *Yeast.*, v. 31, n. 2, p. 47-60, 2014.
- STEENBERGEN, J. N.; CASADEVALL, A. **The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*.** *Microbes. Infect.*, v. 5, n. 7, p. 667-75, 2003.
- STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, A. ***Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages.** *PNAS.*, v. 98, n. 26, p. 15245-15250, 2001.
- STEVENSON, L. G. et al. **Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species.** *J. Clin. Microbiol.*, v. 48, n. 10, p. 3482-3486, 2010.
- SUGITA, T. et al. **Intraspecies diversity of *Cryptococcus laurentii* as revealed by sequences of internal transcribed spacer regions and 28S rRNA gene and taxonomic position of *Cryptococcus laurentii* clinical isolates.** *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 38, n. 4, p. 1468-1471, 2000.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- TAKAHARA, D. T. **Isolamento e identificação de *Cryptococcus neoformans* a partir de excretas de pombos provenientes de locais públicos e residenciais de Cuiabá e Várzea Grande - MT.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 77 f., 2011.
- TAKAHASHI, J. P.; MELHEM, M. S. C. **Uso de fungicidas na agricultura e resistência a antifúngicos na clínica.** *Bol. Inst. Adolfo Lutz.*, v. 24, n. 1, p. 40-41, 2014.
- TAKASHIMA, M. et al. **Three new combinations from the *Cryptococcus laurentii* complex: *Cryptococcus aureus*, *Cryptococcus carnescens* and *Cryptococcus peneaus*.** *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 53, n. 4, p. 1187-94, 2003.
- TAMURA, K. et al. **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0.** *Mol. Biol. Evol.*, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.
- THOMPSON, G. R. et al. **Phenotypic differences of *Cryptococcus* molecular types and their implications for virulence in a drosophila model of infection.** *Infect Immun.*, v. 82, n. 7, p. 3058-3065, 2014.
- TREVIJANO-CONTADOR, N. et al. ***Cryptococcus neoformans* induces antimicrobial responses and behaves as a facultative intracellular pathogen in the non mammalian model *Galleria mellonella*.** *Vir.*, v. 6, n. 1, p. 66-74, 2015.
- TRILLES, L. et al. **Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans*/C. *gattii* species complex.** *Med. Myc.*, v. 50, n. 3, p. 328-332 2012.
- TRILLES, L. et al. **Identification of the Major Molecular Types of *Cryptococcus neoformans* and C. *gattii* by Hyperbranched Rolling Circle Amplification.** *PLoS ONE.*, v. 9, n. 4, p. e94648, 2014.
- TRILLES, L. et al. **Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil.** *Mem. Inst. Osw. Cruz.*, v. 103, n. 5, p. 455-460, 2008.
- TSENG, H. K. et al. **How *Cryptococcus* interacts with the blood-brain barrier.** *Fut. Microb.*, v. 10, n. 10, p. 1669-82, 2015.
- VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. **Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin.** *Antim. Ag. Chemo.*, v. 46, n. 11, p. 3394-400, 2002.
- VANDENBERG, J. D.; SHIMANUKI, H. **Viability of *Bacillus thuringiensis* and its efficacy for larvae of the greater wax moth (*Lepidoptera: Pyralidae*) following storage of treated combs.** *J. Econom.*, v. 83, n. 3, p. 760-765, 1990.
- VANDEPUTTE, J.; WACHTEL, J. L.; STILLER, E. T. **Amphotericin A and B antifungal antibiotics produced by a *Streptomyces*. II The isolation and properties of the crystalline amphotericins.** *Antib. Annu.*, n. 3, p. 587-91, 1956.
- VARGAS, G. et al. **Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by *Candida albicans*.** *Cell. Microbiol.*, v. 17, n. 3, p. 389-407, 2015.
- VARTIVARIAN, S. E. et al. **Localization of mannoprotein in *Cryptococcus neoformans*.** *J. Bacteriol.*, v. 171, n. 12, p. 6850-2, 1989.
- VECCHIARELLI, A. **Immunoregulation by capsular components of *Cryptococcus neoformans*.** *Med. Mycol.*, v. 38, n. 6, p. 407-17, 2000.
- VÉLEZ, N.; ESCANDON, P. **Report on novel environmental niches for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Colombia: *Tabebuia guayacan* and *Roystonea regia*.** *Med. Mycol.*, v. 55, n. 7, p. 794-797, 2017.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- VERONESI, R. F. **Tratado de Infectologia**. Atheneu., 2005.
- VILLAS, M. I. L. **El ciclo biológico de la polilla grande de la cera *Galleria Mellonella* (Linnaeus, 1758)**. 2006.
- VILLENA, S. N. et al. **Capsular polysaccharides galactoxylomannan and glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* induce macrophage apoptosis mediated by Fas ligand**. *Cell. Microbiol.*, v. 10, n. 6, p. 1274-85, 2008.
- VU, D. et al. **DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation. DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation**. *Stud. Myc.*, v. 85, p. 91-105, 2016.
- WAND, M. E. et al. **Use of the *Galleria mellonella* infection model to study the opportunistic pathogen *Klebsiella pneumonia* supports the presence of a multifaceted interaction with the host immune response**. *J. Med. Microb.*, v. 62, p. 1790-8, 2013.
- WANG, H. et al. **In vitro susceptibilities of yeast species to FLUe and VORe as determined by the 2010 National China Hospital Invasive Fungal Surveillance Net (CHIF-NET) study**. *J. Clin. Microbiol.*, v. 50, n. 12 p. 3952-9., 2012.
- WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. ***Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action**. *Infect. Immun.*, v. 63, n. 8, 3131-3136, 1995.
- WANG, Y.; CASADEVALL, A. **Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen-and oxygen-derived oxidants**. *Infect. Immun.*, v. 62, n. 7, p. 3004-3007, 1994.
- WARREN, K.; AMORY, C.; TOBIN, E. **Meningitis Due to *Cryptococcus gattii*: First Reported Case of an Emerging Infectious Disease in an Immunocompetent Patient Residing in the Northeast United States (P2.323)**. *Neurology.*, v. 82, s. 10, 2014.
- WENGENACK, N. L.; BINNICKER, M. J. **Fungal molecular diagnostics**. *Clin. Chest. Med.*, v. 30, n. 2, p. 391-408, 2009.
- WHITE, T. J. et al. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. *Rev. Res. Gate.*, cap. 38, p. 315-322, 1990.
- WOLF, J. M.; RIVERA, J.; CASADEVALL, A. **Serum albumin disrupts *Cryptococcus neoformans* and *Bacillus anthracis* extracellular vesicles**. *Cell. Microbiol.*, v. 14, n. 5, p. 762-73, 2012.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Rapid advice: diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children**. 2011.
- XIAO, M. et al. **Misidentification of a Rare Species, *Cryptococcus laurentii*, by Commonly Used Commercial Biochemical Methods and Matrix- Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Systems: Challenges for Clinical Mycology Laboratories**. *J. Clin. Microb.*, v. 54, n. 1, p. 226- 229, 2016.
- XU, J.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T. G. **Multiple gene genealogies reveal recent dispersion and hybridization in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans***. *Mol. Ecol.*, v. 9, n. 10, p. 1471-81, 2000.
- YONEDA, A.; DOERING, T. L. **A eukaryotic capsular polysaccharide is synthesized intracellularly and secreted via exocytosis**. *Mol. Biol. Cell.*, v. 17, n. 12, p. 5131-40, 2006.
- ZARAGOZA, O.; FRIES, B. C.; CASADEVALL, A. **Induction of Capsule Growth in *Cryptococcus neoformans* by Mammalian Serum and CO₂**. *Inf. Immu.*, v. 71, n. 11, p. 6155-6164, 2003.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

ANEXO A – Ofício de aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 047/2017
kms

Ribeirão Preto, 10 de outubro de 2017.

À Pós- graduanda

Patrícia Helena Grizante Barião

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Regina von Zeska Kress
FCFRP/USP

Prezada Pesquisadora,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado “**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS E VIRULÊNCIA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *CRYPTOCOCCUS SPP.***”, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 438 - CAAE nº 65087117.8.0000.5403**, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP em sua 165^o reunião ordinária, realizada em 12/06/2017, conforme Parecer Consubstanciado do CEP nº 2.134.786.

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

PROF^a. DR^a. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO
Coordenadora do CEP/FCFRP

ANEXO B – Ofício de aprovação do Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de
Ribeirão Preto - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – HCFMRP/USP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 02 de outubro de 2017

Projeto de pesquisa: “CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, SUSCEPTIBILIDADE
A ANTIFÚNGICOS E VIRULÊNCIA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE
CRYPTOCOCCUS SPP.”

Pesquisador responsável: PATRICIA HELENA GRIZANTE BARIO

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
Preto – USP

“O CEP do HC e da FMRP-USP concorda com o parecer ético emitido pelo CEP
da Instituição Proponente, que cumpre as Resoluções Éticas Brasileiras, em
especial a Resolução CNS 466/12. Diante disso, o HCFMRP-USP, como
instituição co-participante do referido projeto de pesquisa, está ciente de suas
co-responsabilidades e de seu compromisso no resguardo da segurança e
bem-estar dos sujeitos desta pesquisa, dispondo de infra-estrutura necessária
para a garantia de tal segurança e bem-estar”.

Ciente e de acordo:

Dr^a Marcia Guimaraes Villanova
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa - HCFMRP-USP

Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho
Coordenador Técnico Científico da
Unidade de Pesquisa Clínica –
HCFMRP-USP

ANEXO C – Ofício referente ao projeto em colaboração com este trabalho. Aprovação do Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Ribeirão Preto - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – HCFMRP/USP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.usp.br

Ribeirão Preto, 05 de janeiro de 2011

Ofício nº 117/2011
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **“COMPARAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE CRYPTOCOCCUS ISOLADOS DE PACIENTES COM DIFERENTES ASPECTOS CLÍNICOS DA INFECÇÃO FÚNGICA”** foi analisado “AD REFERENDUM” pelo Comitê de Ética em Pesquisa e enquadrado na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo HCRP nº 12247/2010.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DR^ª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
ÉRIKA NASCIMENTO
PROF. DR. ROBERTO MARTINEZ (Supervisor)
Depto. de Clínica Médica

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário
FWA – 0000 2733; IRB – 0000 2186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

Anexo D – Dados clínicos dos pacientes sorotipo HIV negativo.

Isolado clínico (n=23)	Paciente	Doenças subjacentes	Fatores predisponentes	Quadro clínico	Evolução da doença	Identificação molecular final
LMC 6046.01	K. J. D.	Doença renal hipertensiva	Insuficiência renal - Desnutrição	Meningite - Infecção da corrente sanguínea - Pneumonia	Óbito	<i>C. neoformans</i> (VNI)
LMC 6047.01	B. L. J.	Nenhuma	Nenhum	Meningite	Cura	<i>C. neoformans</i> (VNI)
LMC 6048.01 / 6048.02	RN A. A. F.	Prematuro - Encefalopatia hipóxica - Displasia pulmonar	Neutropenia	Infecção da corrente sanguínea	Cura	<i>C. laurentii</i>
LMC 6050.01	J. A. B.	Doença de Castleman	Neutropenia	Meningite - Infecção da corrente sanguínea	Óbito	<i>C. neoformans</i>
LMC 6053.01	S. T. B.	Pneumopatia fibrosante	Nenhum	Pneumopatia cavitária - linfadenomegalia mediastinal	Sem seguimento	<i>C. neoformans</i> (VNI)
LMC 6055.01	P. D.	Diabetes mellitus - Distúrbio pulmonar obstrutivo crônico	Exposição em área rural	Massa pulmonar - Úlcera cutânea	Cura	<i>C. gattii</i> (VGII)
LMC 6061.01	J. P. B.	Diabetes mellitus - Psoríase	Nenhum	Sem seguimento	Sem seguimento	<i>C. neoformans</i> (VNI)
LMC 6063.01	A. L.	Linfoma não Hodgkin	Insuficiência renal - Neutropenia - Hiperglicemia	Infecção da corrente sanguínea	Óbito	<i>C. neoformans</i>
LMC 6065.01 / 6065.02	C. F. F. A.	Nenhuma	Drogadição	Meningite - Infecção da corrente sanguínea	Óbito	<i>C. neoformans</i> (VNI)

Anexo D (continuação) – Dados clínicos dos pacientes sorotipo HIV negativo.

Isolado clínico (n=23)	Paciente	Doenças subjacentes	Fatores predisponentes	Quadro clínico	Evolução da doença	Identificação molecular final
LMC 6067.01	R. M.	Transplante renal - Neoplasia de próstata	Imunossupressão	Pneumopatia nodular e cavitária	Cura	C. neoformans (VNI)
LMC 6068.01 / 6068.02	J. M. B.	Transplante renal - Hipotireoidismo	Imunossupressão - Hiperglicemia	Úlcera cutânea - Pneumonia - Meningite - Infecção urinária	Óbito	C. neoformans (VNI)
LMC 6069.01	S. C.	Diabetes mellitus - Neoplasia de próstata - Hepatopatia	Nenhum	Meningite	Cura	C. neoformans (VNI)
LMC 6073.01	N. M. M.	Diabetes mellitus - Cirrose hepática - Neoplasia gástrica	Insuficiência renal	Infecção urinária	Óbito	C. neoformans (VNII)
LMC 6080.01	A. R.	Doença renal crônica	Insuficiência renal	Meningite - Massa cerebral e pulmonar	Cura	C. gattii (VGII)
LMC 6083.01	H. B.	Adenocarcinoma - Cardiopatía valvular	Nenhum	Infecção da corrente sanguínea	Óbito	C. neoformans (VNI)
LMC 6088.01 / 6088.02	J. A. S. B.	Nenhuma	Etilismo	Meningite - Pneumonia	Cura	C. gattii (VGII)
LMC 6091.01 / 6091.02	J. M. S.	Diabetes mellitus - Tuberculose linfática	Nenhum	Meningite	Óbito	C. neoformans (VNI)
LMC 6092.01 / 6092.02 / 6092.03	J. A. L. C.	Adenocarcinoma gástrico	Desnutrição - Etilismo	Meningite - Infecção da corrente sanguínea	Óbito	C. neoformans (VNI)

Anexo D (final) – Dados clínicos dos pacientes sorotipo HIV negativo.

Isolado clínico (n=23)	Paciente	Doenças subjacentes	Fatores predisponentes	Quadro clínico	Evolução da doença	Identificação molecular final
LMC 6095.01	O. B.	Cardiopatia - Distúrbio pulmonar obstrutivo crônico	Exposição a pombos e outras aves	Meningite	Óbito	<i>C. neoformans</i> (VNI)
LMC 6098.01 / 6098.02 / 6098.03	L. S.	Dislipidemia	Exposição a fezes de pombos	Meningite - Criptococoma cerebral	Óbito	<i>C. gattii</i> (VGII)
LMC 6110.01	M. N. P. P.	Diabetes mellitus - Esquizofrenia	Nenhum	Meningite	Sem seguimento	<i>C. gattii</i> (VGII)
LMC 6112.01	H. R. S.	Artrite reumatoide - Cardiopatia - Fibrose pulmonar	Corticoide terapia - Exposição a pombos	Pneumonia	Sem seguimento	<i>C. gattii</i> (VGII)
LMC 6116.01 / 6116.02 / 6116.03 / 6116.04	N. P. O.	Diabetes mellitus - Obesidade	Cuidadora de aves	Meningite - Pneumonia	Óbito	<i>C. gattii</i> (VGII)

Legenda: LMC, Laboratório de Micologia Clínica. Fonte: Dados obtidos nos prontuários médicos do Laboratório de Microbiologia do HCFMRP-USP.

Anexo E – Dados demográficos dos pacientes sorotipo HIV negativo.

Isolado clínico (n=23)	Paciente	Idade	Gênero	Naturalidade	Procedência
LMC 6046.01	K. J. D.	11	Feminino	Piritiba - BA	Ariranha - SP
LMC 6047.01	B. L. J.	18	Masculino	Ribeirão Preto - SP	Jardinópolis - SP
LMC 6048.01 / 6048.02	RN A. A. F.	7dias	Masculino	São Simão - SP	São Simão - SP
LMC 6050.01	J. A. B.	52	Masculino	Ribeirão Preto - SP	Jardinópolis - SP
LMC 6053.01	S. T. B.	32	Feminino	Santa Teresinha - PB	Ribeirão Preto - SP
LMC 6055.01	P. D.	73	Masculino	Sta Cruz Conceição - SP	Pirassununga - SP
LMC 6061.01	J. P. B.	81	Masculino	São Tomás Aquino - MG	Brodowski - SP
LMC 6063.01	A. L.	80	Masculino	Ribeirão Preto - SP	Ribeirão Preto - SP
LMC 6065.01 / 6065.02	C. F. F. A.	21	Masculino	Jardinópolis - SP	Jardinópolis - SP
LMC 6067.01	R. M.	52	Masculino	Ourinhos - SP	Ourinhos - SP
LMC 6068.01 / 6068.02	J. M. B.	62	Masculino	Faxinal - PR	Barrinha - SP
LMC 6069.01	S. C.	70	Masculino	Ribeirão Preto - SP	Ribeirão Preto - SP
LMC 6073.01	N. M. M.	75	Feminino	Guará - SP	Barrinha - SP
LMC 6080.01	A. R.	51	Masculino	Jales - SP	Taquaritinga - SP
LMC 6083.01	H. B.	59	Masculino	Ituverava - SP	Ribeirão Preto - SP
LMC 6088.01 / 6088.02	J. A. S. B.	45	Masculino	Ipira - BA	Brodowski - SP
LMC 6091.01 / 6091.02	J. M. S.	57	Masculino	Ituverava - SP	Ribeirão Preto - SP
LMC 6092.01 / 6092.02 / 6092.03	J. A. L. C.	55	Masculino	Virgem da Lapa - MG	Barrinha - SP
LMC 6095.01	O. B.	75	Feminino	Pedregulho - SP	Luiz Antônio - SP
LMC 6098.01 / 6098.02 / 6098.03	L. S.	46	Masculino	Lunardeli - PR	Jaboticabal - SP
LMC 6110.01	M. N. P. P.	47	Feminino	Cravinhos - SP	Ribeirão Preto - SP
LMC 6112.01	H. R. S.	80	Feminino	Ribeirão Preto - SP	Ribeirão Preto - SP
LMC 6116.01 / 6116.02 / 6116.03 / 6116.04	N. P. O.	54	Feminino	São José Divino - MG	Guariba - SP

Legenda: LMC, Laboratório de Micologia Clínica. Fonte: Dados obtidos nos prontuários médicos do Laboratório de Microbiologia do HCFMRP-USP.

Apêndice A – Dados dos isolados clínicos com todos os resultados obtidos neste estudo.

Isolado clínico	Paciente	Sor.	MB	Data isolamento	Identificação molecular				Virulência			Antifúngicos (µg mL ⁻¹)				
									<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>					
					Esp.	TM	Sequenciamento	MALDI-TOF	% LCP	IPM	<i>G. m.</i>	AMB	FLU	ITR	VOR	5-FC
LMC 6040.01	J. S. O.	HIV+	SG	19/11/2012	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	56,57	+	NR	0,125	1,000	0,031	0,062	1,000
LMC 6041.01	D. M.	HIV+	LCR	04/12/2012	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	53,13	+++	NR	0,062	4,000	0,125	0,062	4,000
LMC 6042.01	D. C.	HIV+	SG	05/12/2012	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	50,35	+++	NR	0,062	2,000	0,031	0,062	1,000
LMC 6043.01	E. G. S.	HIV+	LCR	10/12/2012	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	64,42	+++	NR	0,500	16,000	0,031	0,250	1,000
LMC 6044.01	R. O. N.	HIV+	SG	09/01/2013	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	60,14	+++	NR	0,062	4,000	0,062	0,031	0,250
LMC 6044.02			SG	09/01/2013	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	49,51	+++	NR	0,062	2,000	0,031	0,031	0,250
LMC 6045.01	K. R. A. M.	HIV+	SG	19/02/2013	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	47,57	+++	NR	0,062	2,000	0,031	0,062	0,500
LMC 6046.01	K. J. D.	HIV-	SG	19/03/2013	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	61,34	+++	+	0,062	2,000	0,125	0,062	2,000
LMC 6047.01	B. L. J.	HIV-	LCR	01/04/2013	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	53,16	+++	+	0,250	2,000	0,125	0,250	2,000
LMC 6048.01	RN A. A. F.	HIV-	SG	06/06/2013	ND	ND	<i>C. laurentii</i>	<i>C. laurentii</i>	ND	+	NR	0,125	2,000	0,125	0,500	64,000
LMC 6048.02			PC	17/06/2013	ND	ND	NR	<i>C. laurentii</i>	ND	+	++	0,125	4,000	0,250	0,500	64,000
LMC 6049.01	G. S.	HIV+	SG	30/09/2013	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	52,08	+	NR	0,250	1,000	0,062	0,062	2,000
LMC 6050.01	J. A. B.	HIV-	SG	02/10/2013	<i>C. n.</i>	ND	<i>Cryptococcus</i> spp.	<i>C. n. var. grubii</i>	35,80	+++	++	0,125	2,000	0,062	0,062	2,000
LMC 6051.01	J. G. A. S.	HIV+	SG	07/10/2013	<i>C. n.</i>	VNII	NR	NR	64,84	+++	NR	0,250	2,000	0,125	0,062	1,000
LMC 6051.02			LCR	10/10/2013	<i>C. n.</i>	VNII	NR	NR	50,50	+++	NR	0,125	0,500	0,125	0,031	2,000
LMC 6052.01	M. A. G.	HIV+	LCR	21/10/2013	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	49,66	+	NR	0,125	4,000	0,062	0,031	1,000
LMC 6053.01	S. T. B.	HIV-	EE	24/10/2013	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	59,63	+++	+	0,031	1,000	0,062	0,062	2,000
LMC 6054.01	F. J. O. N.	HIV+	SG	31/10/2013	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	63,48	+++	NR	0,031	0,250	0,125	0,062	2,000
LMC 6055.01	P. D.	HIV-	BP	08/10/2013	<i>C. g.</i>	VGII	<i>C. gattii</i>	NR	63,44	+++	+++	0,062	8,000	0,125	0,125	0,500
LMC 6056.01			LCR	08/11/2013	<i>C. n.</i>	VNII	NR	NR	52,44	+++	NR	0,125	1,000	0,125	0,062	2,000
LMC 6056.02	A. F. S.	HIV+	MO	23/11/2013	<i>C. n.</i>	VNII	NR	NR	58,46	+++	NR	0,250	1,000	0,125	0,031	2,000
LMC 6056.03			LCR	06/12/2013	<i>C. n.</i>	VNII	NR	NR	59,85	+++	NR	0,250	1,000	0,125	0,031	1,000

Apêndice A (continuação 1) – Dados dos isolados clínicos com todos os resultados obtidos neste estudo.

Isolado clínico	Paciente	Sor.	MB	Data isolamento	Identificação molecular				Virulência			Antifúngicos ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				
									<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>					
					Esp.	TM	Sequenciamento	MALDI-TOF	% LCP	IPM	G. m.	AMB	FLU	ITR	VOR	5-FC
LMC 6057.01	D. A. S. P.	HIV+	SG	18/11/2013	ND	VNI	<i>Cryptococcus</i> spp.	<i>C. n. var. grubii</i>	53,93	+++	NR	0,125	2,000	0,125	0,125	1,000
LMC 6058.01	V. P.	HIV+	SG	17/01/2014	ND	ND	<i>C. gattii</i>	NR	43,63	+++	NR	0,125	2,000	0,062	0,031	1,000
LMC 6059.01	E. L. C.	HIV+	LCR	29/01/2014	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	49,74	+++	NR	0,125	1,000	0,031	0,062	1,000
LMC 6060.01			SG	27/02/2014	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	55,65	+++	NR	0,250	2,000	0,031	0,062	2,000
LMC 6060.02	J. C. F.	HIV+	LCR	07/03/2014	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	56,47	+++	NR	0,250	4,000	0,031	0,062	2,000
LMC 6060.03			LCR	26/03/2014	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	51,72	+++	NR	0,031	0,500	0,125	0,125	2,000
LMC 6061.01	J. P. B.	HIV-	SG	14/03/2014	ND	VNI	<i>Cryptococcus</i> spp.	NR	49,77	+++	+	0,031	0,500	0,125	0,062	1,000
LMC 6062.01			LCR	17/03/2014	ND	VNI	<i>Cryptococcus</i> spp.	<i>C. n. var. grubii</i>	62,25	+++	NR	0,031	1,000	0,125	0,062	1,000
LMC 6062.02	F. N. S.	HIV+	LCR	18/03/2014	ND	VNI	<i>Cryptococcus</i> spp.	<i>C. n. var. grubii</i>	54,47	+++	NR	0,031	0,500	0,125	0,062	1,000
LMC 6063.01	A. L.	HIV-	SG	28/03/2014	ND	ND	<i>Cryptococcus</i> spp.	<i>C. n. var. grubii</i>	55,02	+++	+++	0,031	2,000	0,062	0,062	2,000
LMC 6064.01			SG	10/06/2014	ND	VNI	<i>Cryptococcus</i> spp.	<i>C. n. var. grubii</i>	59,72	+++	NR	0,031	0,500	0,062	0,125	2,000
LMC 6064.02	V. S. M.	HIV+	LCR	06/06/2014	ND	VNI	<i>Cryptococcus</i> spp.	<i>C. n. var. grubii</i>	62,37	+++	NR	0,250	1,000	0,125	1,000	2,000
LMC 6064.03			LCR	10/07/2014	ND	VNI	<i>Cryptococcus</i> spp.	<i>C. n. var. grubii</i>	57,87	+++	NR	0,125	1,000	0,125	0,062	0,500
LMC 6065.01			LCR	18/06/2014	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	55,93	+++	+++	0,125	1,000	0,062	0,062	1,000
LMC 6065.02	C. F. F. A.	HIV-	SG	17/06/2014	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	53,15	+++	NR	0,062	1,000	0,125	0,125	1,000
LMC 6066.01	F. M. S.	HIV+	LCR	30/06/2014	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	58,46	+++	NR	0,062	2,000	0,125	0,250	4,000
LMC 6067.01	R. M.	HIV-	LBA	28/07/2014	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	47,73	+++	+++	0,062	0,500	0,062	0,250	2,000

Apêndice A (continuação 2) – Dados dos isolados clínicos com todos os resultados obtidos neste estudo.

Isolado clínico	Paciente	Sor.	MB	Data isolamento	Identificação molecular				Virulência			Antifúngicos ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				
									<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>					
					Esp.	TM	Sequenciamento	MALDI-TOF	% LCP	IPM	G. m.	AMB	FLU	ITR	VOR	5-FC
LMC 6068.01	J. M. B.	HIV-	US	02/10/2014	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	53,68	+++	++	0,125	0,500	0,062	1,000	1,000
LMC 6068.02			LCR	13/10/2014	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	64,34	+++	++	0,062	8,000	0,125	0,062	2,000
LMC 6069.01	S. C.	HIV-	LCR	06/10/2014	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	51,18	+++	++	0,062	0,500	0,031	1,000	2,000
LMC 6070.01			LCR	29/12/2014	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	61,90	+++	NR	0,125	1,000	0,125	0,125	0,500
LMC 6070.02	G. G. S.	HIV+	SG	01/01/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	59,18	+++	NR	0,125	1,000	0,125	0,062	1,000
LMC 6070.03			LCR	09/06/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	59,52	++	NR	0,125	0,500	0,125	0,031	0,500
LMC 6070.04			SG	08/06/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	60,97	++	NR	0,062	1,000	0,125	0,062	2,000
LMC 6071.01	A. J. S.	HIV+	LCR	09/01/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	57,96	+++	NR	0,125	1,000	0,125	0,062	2,000
LMC 6072.01	J. J. D. J.	HIV+	LCR	26/01/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	58,35	+++	NR	0,031	2,000	0,125	0,500	4,000
LMC 6072.02			LCR	13/03/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	73,52	++	NR	0,031	1,000	0,125	0,125	2,000
LMC 6073.01	N. M. M	HIV-	US	26/01/2015	<i>C. n.</i>	VNII	NR	NR	57,02	+++	+++	0,125	0,500	0,031	0,500	2,000
LMC 6074.01	S. C. S. S.	ND	LCR	30/01/2015	<i>C. g.</i>	VGII	<i>C. gattii</i>	NR	59,35	+++	+++	0,062	16,000	0,125	0,250	1,000
LMC 6075.01	M. A. S.	HIV+	LCR	20/02/2015	ND	VNI	<i>Cryptococcus</i> spp.	<i>C. n. var. grubii</i>	51,01	++	NR	0,125	1,000	0,125	0,062	2,000
LMC 6075.02			SG	19/02/2015	ND	VNI	<i>Cryptococcus</i> spp.	<i>C. n. var. grubii</i>	52,20	++	NR	0,062	1,000	0,125	0,125	2,000
LMC 6078.01	E. C. F. C.	HIV+	LCR	04/02/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	60,02	++	NR	0,125	2,000	0,125	0,125	4,000
LMC 6079.01	A. F. J.	HIV+	SG	04/02/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	61,75	++	NR	0,125	1,000	0,125	0,062	1,000
LMC 6079.02			SG	05/02/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	52,36	++	NR	0,062	0,500	0,125	0,125	4,000
LMC 6080.01	A. R.	HIV-	LCR	16/02/2015	<i>C. g.</i>	VGII	<i>Cryptococcus</i> spp.	<i>C. gattii</i>	64,83	++	++	0,062	4,000	0,250	1,000	2,000

Apêndice A (continuação 3) – Dados dos isolados clínicos com todos os resultados obtidos neste estudo.

Isolado clínico	Paciente	Sor.	MB	Data isolamento	Identificação molecular				Virulência			Antifúngicos ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				
					Esp.	TM	Sequenciamento	MALDI-TOF	<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>	AMB	FLU	ITR	VOR	5-FC
									%	LCP	IPM					
											<i>G. m.</i>					
LMC 6081.01	A. E. F.	HIV+	LBA	27/02/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	65,53	++	NR	0,125	4,000	0,125	0,062	0,500
LMC 6082.01	R. A. P.	HIV+	LCR	16/03/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	63,13	++	NR	0,125	2,000	0,125	0,062	0,500
LMC 6082.02			SG	14/03/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	55,21	++	NR	0,062	0,500	0,062	0,062	4,000
LMC 6083.01	H. B.	HIV-	SG	10/03/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	58,65	++	+++	0,125	1,000	0,125	0,031	0,500
LMC 6084.01	S. M. F.	HIV+	LCR	27/03/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	66,90	++	NR	0,125	1,000	0,062	0,125	1,000
LMC 6084.02			SG	30/03/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	62,49	++	NR	0,062	0,500	0,062	0,125	1,000
LMC 6085.01	E. P. C.	HIV+	MO	01/04/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	59,89	++	NR	0,125	1,000	0,125	0,250	1,000
LMC 6086.01	A. F. B.	HIV+	SG	27/04/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	54,26	++	NR	0,125	0,250	0,250	0,031	4,000
LMC 6087.01			LCR	05/05/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	48,13	++	NR	0,062	1,000	0,125	0,250	0,500
LMC 6087.02	J. S. S.	HIV+	LCR	07/05/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	61,00	++	NR	0,062	0,500	0,125	0,125	1,000
LMC 6087.03			LCR	18/05/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	50,85	++	NR	0,125	4,000	0,250	0,031	0,500
LMC 6088.01	J. A. S. B.	HIV-	LCR	18/05/2015	<i>C. g.</i>	VGII	<i>C. gattii</i>	NR	46,45	++	+++	0,062	0,500	0,125	0,125	0,500
LMC 6088.02			LCR	21/05/2015	<i>C. g.</i>	VGII	<i>C. gattii</i>	NR	60,33	++	+++	0,031	4,000	0,250	1,000	0,500
LMC 6089.01	A. L. S.	HIV+	LCR	18/05/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	55,96	+	NR	0,062	1,000	0,125	0,062	0,500
LMC 6089.02			SG	18/05/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	60,40	++	NR	0,062	2,000	0,125	0,062	4,000
LMC 6089.03			SG	18/05/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	52,20	++	NR	0,062	4,000	0,125	0,062	0,500
LMC 6090.01	M. A. B.	HIV+	SG	08/06/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	57,40	++	NR	0,062	4,000	0,125	0,031	1,000
LMC 6091.01	J. M. S.	HIV-	LCR	24/06/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	50,65	++	+++	0,062	0,500	0,125	0,250	2,000
LMC 6091.02			LCR	29/06/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	58,52	++	+++	0,062	0,500	0,125	0,031	0,500
LMC 6092.01	J. A. L. C.	HIV-	LCR	14/07/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	45,49	++	+++	0,125	4,000	0,125	0,031	0,500
LMC 6092.02			SG	17/07/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	47,24	++	NR	0,062	2,000	0,062	0,062	0,500
LMC 6092.03			LCR	17/07/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	64,83	++	NR	0,031	1,000	0,062	0,031	0,500

Apêndice A (continuação 4) – Dados dos isolados clínicos com todos os resultados obtidos neste estudo.

Isolado clínico	Paciente	Sor.	MB	Data isolamento	Identificação molecular				Virulência			Antifúngicos (µg mL ⁻¹)						
									<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>							
					Esp.	TM	Sequenciamento	MALDI-TOF	% LCP	IPM	<i>G. m.</i>	AMB	FLU	ITR	VOR	5-FC		
LMC 6093.01	O. A.	HIV+	SG	20/07/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	57,85	++	NR	0,031	2,000	0,125	0,062	0,500		
LMC 6093.02			LCR	21/07/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	46,12	++	NR	0,062	1,000	0,125	0,062	2,000		
LMC 6094.01	A. J. M. R.	HIV+	BG	20/07/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	58,91	++	NR	0,062	1,000	0,062	0,062	2,000		
LMC 6095.01	O. B.	HIV-	LCR	20/07/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	54,51	++	+	0,062	0,500	0,250	0,125	0,500		
LMC 6096.01	C. L. T.	HIV+	LBA	04/09/2015	ND	VGII	<i>C. gattii</i>	<i>C. gattii</i>	49,44	++	NR	0,125	16,000	0,125	0,125	0,500		
LMC 6097.01			LCR	03/11/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	51,93	++	NR	0,125	8,000	0,250	0,125	1,000		
LMC 6097.02			A. N. S.	HIV+	BP	04/11/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	55,00	++	NR	0,062	1,000	0,125	0,031	0,500
LMC 6097.03					SG	03/11/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	49,95	++	NR	0,125	0,500	0,125	0,062	2,000
LMC 6097.04	L. S.	HIV-	LCR	26/11/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	56,89	+++	NR	0,125	1,000	0,125	0,031	0,250		
LMC 6098.01			LCR	17/11/2015	<i>C. g.</i>	VGII	<i>C. gattii</i>	NR	61,36	++	++	0,031	1,000	0,125	0,125	0,500		
LMC 6098.02			LCR	27/11/2015	<i>C. g.</i>	VGII	<i>C. gattii</i>	NR	64,22	++	NR	0,062	1,000	0,125	0,125	2,000		
LMC 6098.03			LCR	30/11/2015	<i>C. g.</i>	VGII	<i>C. gattii</i>	NR	49,59	++	++	0,062	1,000	0,125	0,062	4,000		
LMC 6099.01	D. A. B. C.	HIV+	SG	15/12/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	51,99	++	NR	0,062	2,000	0,031	0,031	0,250		
LMC 6099.02			SG	11/12/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	62,12	+++	NR	0,062	2,000	0,031	0,031	0,500		
LMC 6099.03			LCR	16/12/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	53,29	+++	NR	0,062	0,500	0,031	0,031	0,250		
LMC 6100.01	L. C. C.	HIV+	LBA	03/12/2015	ND	ND	<i>Cryptococcus</i> spp.	<i>C. n. var. grubii</i>	47,69	++	NR	0,031	2,000	0,125	0,250	0,500		
LMC 6101.01	D. P.	HIV+	LCR	18/12/2015	ND	VNI	<i>Cryptococcus</i> spp.		54,90	+++	NR	1,000	2,000	0,125	0,031	0,250		
LMC 6101.02			LCR	09/12/2015	ND	VNI	NR	<i>C. n. var. grubii</i>	56,17	+	NR	0,062	0,500	0,031	0,031	0,250		
LMC 6102.01	L. C. S.	ND	SG	30/12/2015	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	51,31	+++	+++	0,062	1,000	0,062	0,062	0,500		

Apêndice A (continuação 5) – Dados dos isolados clínicos com todos os resultados obtidos neste estudo.

Isolado clínico	Paciente	Sor.	MB	Data isolamento	Identificação molecular				Virulência			Antifúngicos ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				
									<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>					
					Esp.	TM	Sequenciamento	MALDI-TOF	% LCP	IPM	<i>G. m.</i>	AMB	FLU	ITR	VOR	5-FC
LMC 6103.01	C. M. P.	HIV+	LCR	03/02/2016	ND	VNI	<i>Cryptococcus</i> spp.	<i>C. n. var. grubii</i>	50,66	+++	NR	0,062	2,000	0,125	0,062	1,000
LMC 6103.02			SG	27/01/2016	ND	VNI	<i>Cryptococcus</i> spp.	<i>C. n. var. grubii</i>	55,58	+++	NR	0,125	2,000	0,125	0,062	1,000
LMC 6104.01	K. H. F. L. M.	HIV+	SG	12/01/2016	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	54,10	+++	NR	0,062	2,000	0,062	0,031	0,500
LMC 6104.02			SG	12/01/2016	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	53,75	+++	NR	0,062	0,500	0,062	0,125	0,250
LMC 6104.03			LCR	08/01/2016	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	56,58	+++	NR	0,125	0,500	0,062	0,062	0,500
LMC 6105.01	R. S. B.	HIV+	LCR	18/01/2016	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	55,76	+++	NR	0,062	0,500	0,062	0,250	0,125
LMC 6105.02			LCR	27/01/2016	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	54,28	+++	NR	0,062	0,500	0,250	0,500	1,000
LMC 6105.03			SG	01/02/2016	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	52,39	+++	NR	0,250	2,000	0,125	0,500	0,125
LMC 6105.04			SG	04/02/2016	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	53,05	+++	NR	0,031	2,000	0,125	0,500	0,125
LMC 6106.01	G. J. S.	HIV+	LCR	22/01/2016	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	49,94	+++	NR	0,031	1,000	0,125	0,250	0,250
LMC 6106.02			LCR	28/01/2016	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	51,80	+++	NR	0,062	4,000	0,250	0,500	0,125
LMC 6107.01	A. B. N.	HIV+	LCR	29/02/2016	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	61,78	+++	NR	0,125	2,000	0,125	0,062	1,000
LMC 6107.02			SG	14/03/2016	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	52,28	+++	NR	0,031	0,500	0,125	0,062	0,500
LMC 6107.03			SG	14/03/2016	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	52,63	+++	NR	0,062	2,000	0,125	0,062	0,250
LMC 6108.01	M. C.	ND	SG	29/03/2016	ND	ND	<i>C. laurentii</i>	<i>C. laurentii</i>	ND	+	++	0,500	4,000	0,125	0,125	64,000
LMC 6109.01	L. C. P. O.	HIV+	SG	28/03/2016	<i>C. n.</i>	VNI	<i>Cryptococcus</i> spp.	<i>C. n. var. grubii</i>	50,24	+++	NR	0,250	4,000	0,125	0,062	1,000
LMC 6110.01	M. N. P. P.	HIV-	LCR	29/03/2016	ND	VGII	<i>C. gattii</i>	NR	49,67	+++	+	0,250	4,000	0,250	0,062	1,000
LMC 6111.01	M. E. A. F.	HIV+	LCR	15/08/2016	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	60,42	+++	NR	0,500	2,000	0,250	0,125	2,000
LMC 6112.01	H. R. S.	HIV-	EI	26/09/2016	<i>C. g.</i>	VGII	<i>C. gattii</i>	NR	48,84	+++	+++	0,125	8,000	0,250	0,062	1,000
LMC 6113.01	D. T. D.	HIV+	LCR	03/10/2016	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	52,05	+++	NR	0,250	2,000	0,125	0,062	1,000

Apêndice A (continuação 6) – Dados dos isolados clínicos com todos os resultados obtidos neste estudo.

Isolado clínico	Paciente	Sor.	MB	Data isolamento	Identificação molecular				Virulência			Antifúngicos (µg mL ⁻¹)				
									<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>					
					Esp.	TM	Sequenciamento	MALDI-TOF	%	LCP	IPM	G. m.	AMB	FLU	ITR	VOR
LMC 6114.01	F. H. S. R.	ND	LCR	14/10/2016	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	52,06	+++	+	0,250	2,000	0,125	0,062	1,000
LMC 6115.01	R. A. P.	HIV+	SG	20/10/2016	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	49,86	+++	NR	0,125	2,000	0,125	0,031	1,000
LMC 6116.01	N. P. O.	HIV-	LCR	07/11/2016	<i>C. g.</i>	VGII	NR	NR	64,38	+++	NR	0,500	8,000	0,250	0,250	1,000
LMC 6116.02			LCR	08/11/2016	<i>C. g.</i>	VGII	<i>C. gattii</i>	NR	57,33	+++	NR	0,500	4,000	0,250	0,125	1,000
LMC 6116.03			LCR	08/11/2016	<i>C. g.</i>	VGII	<i>C. gattii</i>	NR	68,33	+++	++	0,250	2,000	0,250	0,125	1,000
LMC 6116.04			LCR	08/11/2016	<i>C. g.</i>	VGII	<i>C. gattii</i>	NR	58,96	+++	++	0,125	8,000	0,125	0,062	1,000
LMC 6117.01	A. D. F.	HIV+	LCR	25/11/2016	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	57,70	+++	NR	1,000	2,000	0,125	0,062	2,000
LMC 6117.02			LCR	07/12/2016	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	56,95	+++	NR	0,500	2,000	0,125	0,062	1,000
LMC 6118.01	E. B. N.	ND	SG	01/12/2016	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	53,95	+++	++	0,125	2,000	0,250	0,062	1,000
LMC 6119.01	M. V. J. S.	HIV+	LCR	26/12/2016	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	52,04	+++	NR	0,250	2,000	0,125	0,062	1,000
LMC 6119.02			LCR	28/12/2016	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	48,23	+++	NR	0,500	2,000	0,125	0,062	1,000
LMC 6119.03			SG	29/12/2016	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	59,14	+++	NR	0,500	1,000	0,125	0,062	0,500
LMC 6120.01	C. A. S.	HIV+	LCR	27/01/2017	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	55,18	+++	NR	0,500	0,500	0,125	0,031	0,500
LMC 6121.01	G. N.	HIV+	LCR	19/12/1016	<i>C. n.</i>	VNI	NR	NR	58,16	+++	NR	0,500	2,000	0,125	0,031	2,000
*ATCC 32269	SI	SI	LCR	SI	<i>C. g.</i>	NR	NR	NR	67,88	+	+	0,062	0,250	0,125	0,062	0,125
*ATCC 90112	SI	SI	LCR	SI	<i>C. n.</i>	NR	NR	NR	58,03	++	+	0,062	0,500	0,125	0,031	0,125
*ATCC 22019	SI	SI	SI	SI	NR	NR	NR	NR	NR	-	NR	0,500	4,000	0,125	0,500	2,000
*WM148	SI	SI	SI	SI	NR	VNII	<i>Cryptococcus</i> spp.	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

Apêndice A (final) – Dados dos isolados clínicos com todos os resultados obtidos neste estudo.

Isolado clínico	Paciente	Sor.	MB	Data isolamento	Identificação molecular				Virulência			Antifúngicos ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				
									<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>					
					Esp.	TM	Sequenciamento	MALDI-TOF	% LCP	IPM	<i>G. m.</i>	AMB	FLU	ITR	VOR	5-FC
*WM626	SI	SI	SI	SI	NR	VNII	<i>Cryptococcus</i> spp.	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
*WM628	SI	SI	SI	SI	NR	VNIII	<i>Cryptococcus</i> spp.	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
*WM629	SI	SI	SI	SI	NR	VNIV	<i>Cryptococcus</i> spp.	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
*WM179	SI	SI	SI	SI	NR	VGI	<i>Cryptococcus</i> spp.	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
*WM178	SI	SI	SI	SI	NR	VGII	<i>C. gattii</i>	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
*WM175	SI	SI	SI	SI	NR	VGIII	<i>C. gattii</i>	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
*WM779	SI	SI	SI	SI	NR	VGIV	<i>C. gattii</i>	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

Legenda: Sor., sorologia HIV; -, negativo; +, positivo; NR, não realizado; ND, não determinado; MB, material biológico; LCR, líquido cefalorraquidiano; SG, sangue; BG, biopsia de gânglio; MO, medula óssea; LBA, lavado broncoalveolar; US, urina sonda; EE, escarro espontâneo; PC, ponta de cateter; EI, escarro induzido; BP, biopsia de pele; *C.n.*, *Cryptococcus neoformans*; *C.g.*, *Cryptococcus gattii*; Esp., espécie; TM, tipo molecular; MALDI-TOF, ionização e dessorção a laser assistida por matriz; %LCP, porcentagem linear da cápsula polissacarídica; IPM, intensidade da produção de melanina; *G.m.*, *Galleria mellonella*; AMB, anfotericina B, FLU, fluconazol; ITR, itraconazol; VOR, voriconazol; 5-FC, 5-flucitosina; *, linhagens controle. Fonte: Autoria Própria.