

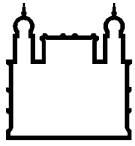
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ANÁLISE FENOTÍPICA DE ISOLADOS DE *Cryptococcus neoformans*  
COLETADOS NO ESTADO DE RORAIMA, NORTE DO BRASIL

HALAN DENY DAL PUPO

Rio de Janeiro  
Junho de 2020



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

HALAN DENY DAL PUPO

**ANÁLISE FENOTÍPICA DE ISOLADOS DE *Cryptococcus neoformans*  
COLETADOS NO ESTADO DE RORAIMA, NORTE DO BRASIL**

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

**Orientador:** Prof. Dr. Marcio L. Rodrigues

**RIO DE JANEIRO**

Junho de 2020

Dal Pupo, Halan Deny.

Análise fenotípica de isolados de *Cryptococcus neoformans* coletados no estado de Roraima, norte do Brasil / Halan Deny Dal Pupo. - Rio de Janeiro, 2020.

90 f.; il.

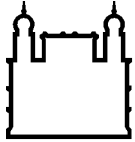
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2020.

Orientador: Marcio Lourenço Rodrigues.

Bibliografia: f. xvii-90

1. Teste sensibilidade antifúngicos. 2. Fontes ambientais. 3. Produção de fatores virulência. 4. Diversidade capsular. 5. *Cryptococcus neoformans*. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**AUTOR: HALAN DENY DAL PUPO**

**ANÁLISE FENOTÍPICA DE ISOLADOS DE *Cryptococcus neoformans*  
COLETADOS NO ESTADO DE RORAIMA, NORTE DO BRASIL**

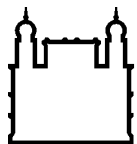
**ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcio L. Rodrigues**

**Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Lucimar Ferreira Kneipp Fiocruz - Presidente**  
**Prof. Dr. Haroldo Cesar de Oliveira – ICC Fiocruz - Curitiba**  
**Prof. Dr. Leonardo Nimrichter - UFRJ**  
**Prof. Dra. Fernanda Lopes Fonseca – CDTS Fiocruz**  
**Prof. Dra. Juliana Rizzo – Instituto Pasteur - França**

Rio de Janeiro, 04 de Junho de 2020.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.**

Aos meus queridos pais  
Juvelino e Glória  
pelas oportunidades que proporcionaram a mim e ao Ian  
priorizando educação, respeito e hombridade

A minha esposa Kenia  
meu alicerce e “companheira de luta”  
por sua infinita compreensão, companheirismo e apoio  
incansável durante essa jornada

A Sabrina  
filha amada, luz da minha vida  
pelo carinho e compreensão durante a  
minha ausência para realização deste trabalho

Ao Ian meu irmão  
pelos incentivos e ponderação.

Carinhosamente dedico.

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela existência, saúde, fé e esperança em dias sempre melhores.

Ao meu orientador Dr. Márcio L. Rodrigues, pelo aprendizado, atenção, compreensão e paciência, sempre que precisei. Agradeço imensamente por aceitar esse desafio. Muito obrigado por tudo.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária (IOC/Fiocruz) Dr. Rafael Freitas e a secretária Rita Gomes, pela prestatividade, competência e preciosas orientações recebidas no decorrer desta Pós-Graduação.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária (IOC/Fiocruz) pela disposição, ensinamentos e incentivo.

À professora Dra. Silvana Fortes (UFRR), por acreditar, apoiar, incentivar e gentilmente disponibilizar os isolados da sua Micoteca para compor os isolados deste estudo.

Aos doutores João Nobrega e Lumena Machado (USP), que gentilmente caracterizaram os genótipos dos isolados.

À Dra. Soledade da Secretaria de Vigilância à Saúde de Boa Vista, pela colaboração dos dados epidemiológicos.

Aos colegas de Pós-Graduação em Biologia Parasitária (IOC/Fiocruz/DINTER-RR), Alberto, Luciano, Nathália, Joseneide, Fábio, Jaime e Raquel, muito obrigado pela amizade e convivência.

Aos colegas do laboratório de Micologia (UFRJ), Priscila, Luna, Cacau, Juliana e Fernanda, pela alegria de conviver durante todas as vezes que estive aí no laboratório, sem esquecer do apoio nesta significativa área de estudo que é a micologia, e principalmente por compartilhar meios de cultura.

Ao amigo Rodrigo Godinho, pelos ensinamentos, preciosas dicas e ajuda científica incondicionalmente. Muito obrigado.

Ao Professor Leonardo Nimrichter, pela sua prestatividade e bom-humor. E aos demais colegas e estagiários do seu laboratório pelo suporte e dos momentos de descontração na “hora do cafezinho”.

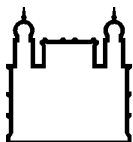
A Faculdades Cathedral e Fares, pela disponibilidade de meios de cultura, equipamentos, suporte, auxílio e liberação quando necessitei.

Aos membros da Banca Examinadora.

Agradeço aos meus sogros, José e Cleusa, exemplos de empatia e fé.

“Um pouco de Ciência nos afasta de  
Deus. Muito, nos aproxima.”  
(Louis Pasteur)





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### ANÁLISE FENOTÍPICA DE ISOLADOS DE *Cryptococcus neoformans* COLETADOS NO ESTADO DE RORAIMA, NORTE DO BRASIL

#### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

**Halan Deny Dal Pupo**

As espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gatti* representam patógenos fúngicos ambientais encapsulados que afetam não apenas indivíduos imunocomprometidos, mas também indivíduos aparentemente imunocompetentes. No Brasil, a criptococose permanece sendo uma das infecções fúngicas sistêmicas mais importantes. Em humanos, a fagocitose de *Cryptococcus* hipocapsular por macrófagos foi associada com longo prazo de sobrevida do paciente. Com base no papel fundamental da cápsula criptocócica na doença, analisamos a diversidade de estruturas capsulares em 23 isolados de excretas de pombos, coletados nos municípios de Boa Vista, Bonfim e Pacaraima, no estado de Roraima (Norte do Brasil). Todos os isolados foram identificados como *C. neoformans* (genótipo VNI) por espectrometria de massa MALDI-TOF. Através de uma combinação de microscopia de fluorescência, citometria de fluxo, ELISA e métodos espectrofotométricos, cada isolado foi fenotipicamente caracterizado, o que incluiu medidas de taxas de crescimento a 30 e 37°C, pigmentação, tamanho do corpo celular, dimensões capsulares, reatividade sorológica, produção de urease e capacidade de secreção de glucuronoxilomanana (GXM), o principal componente capsular de *C. neoformans*. Foi também avaliada a sensibilidade aos antifúngicos fluconazol e AmB. Com exceção da melanização, uma grande diversidade foi observada considerando todos os parâmetros testados em nosso estudo. Vale ressaltar que isolados hiper e hipo produtores de GXM foram identificados, além de isolados com perfis de hiper e hiporreatividade com o anticorpo monoclonal reconhecedor do polissacarídeo. As dimensões capsulares também foram altamente variáveis nos isolados analisados. A produção de GXM extracelular foi correlacionada positivamente com dimensões capsulares, atividade da urease e tamanho da célula. Inesperadamente, as concentrações de GXM não se correlacionaram com a reatividade sorológica com a cápsula criptocócica. Os testes de sensibilidade aos antifúngicos revelaram alta sensibilidade dos isolados frente a AmB. Foram observados valores de susceptibilidade superiores para o fluconazol (8.0 µg/mL) em dois isolados (151A1 e 176A1) em comparação com a cepa padrão H99 / ATCC 208821 (2.0 µg/mL). Estes resultados revelam uma alta diversidade na capacidade de *C. neoformans* ambientais em produzir componentes capsulares, o que pode afetar o curso da criptococose humana.

# INSTITUTO OSWALDO CRUZ

## PHENOTYPIC ANALYSIS OF *Cryptococcus neoformans* ISOLATES COLLECTED IN THE STATE OF RORAIMA, NORTHERN BRAZIL

Abstract

PHD THESIS IN PARASITE BIOLOGY

**Halan Deny Dal Pupo**

The species *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gatti* represent encapsulated environmental fungal pathogens that affect not only immunocompromised individuals, but also apparently immunocompetent individuals. In Brazil, cryptococcosis remains one of the most important systemic fungal infections. In humans, the macrophage hypocapsular *Cryptococcus* phagocytosis was associated with long-term patient survival. Based on the fundamental role of the cryptococcal capsule in the disease, we analyzed the diversity of capsular structures in 23 isolates of pigeon excreta, collected in the municipalities of Boa Vista, Bonfim and Pacaraima, in the state of Roraima (Northern Brazil). All isolates were identified as *C. neoformans* (VNI genotype) by MALDI-TOF mass spectrometry. Through a combination of fluorescence microscopy, flow cytometry, ELISA and spectrophotometric methods, each isolate was characterized at the phenotypic level, which included measures of growth rates at 30 and 37°C, pigmentation, cell body size, capsular dimensions, serological reactivity, urease production and secretion capacity of extracellular glucuronoxylomannan (GXM), the main capsular component of *C. neoformans*. The sensitivity to fluconazole and AmB antifungals was also assessed. With the exception of melanization, a great diversity was observed considering all the parameters tested in our study. It is noteworthy that hyper and hypo GXM-producing isolates were identified, in addition to isolates with hyper and hyporeactivity profiles with the polysaccharide-recognizing monoclonal antibody. Capsular dimensions were also highly variable in the analyzed isolates. The production of extracellular GXM was positively correlated with capsular dimensions, urease activity and cell size. Unexpectedly, the GXM concentrations did not correlate with the serological reactivity with the cryptococcal capsule. The sensitivity tests to antifungals revealed high sensitivity of the isolates to AmB. Higher susceptibility values for fluconazole (8.0 µg / mL) were observed in two isolates (151A1 and 176A1) compared to the standard H99 / ATCC 208821 strain (2.0 µg / mL). These results reveal a high diversity in the capacity of environmental *C. neoformans* to produce capsular components, which can affect the course of human cryptococcosis.

# ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>RESUMO</b>   | <b>ix</b> |
| <b>ABSTRACT</b>   | <b>x</b>  |
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1.1 Infecções fúngicas</b> .....   | <b>1</b>  |
| 1.1.1 Membros do gênero <i>Cryptococcus</i> e a Criptococose.....   | 3         |
| 1.1.2 Classificação de <i>Cryptococcus</i> .....  | 5         |
| <b>1.2 Interação fungo-ambiente</b> .....   | <b>8</b>  |
| <b>1.3 Fatores de virulência do gênero <i>Cryptococcus</i></b> .....  | <b>9</b>  |
| 1.3.1 Cápsula polissacarídica.....  | 10        |
| 1.3.2 Termotolerância.....  | 12        |
| 1.3.3 Atividade urease.....   | 13        |
| 1.3.4 Melanina.....   | 14        |
| <b>1.4 Agentes antifúngicos</b> .....   | <b>16</b> |
| 1.4.1 Mecanismos de resistência e testes de susceptibilidade.....   | 19        |
| <b>1.5 Análise por MALDI-TOF (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Flight Mass Spectrometry</i>)</b> ..... | <b>24</b> |
| <b>1.6 Área geográfica de estudos</b> .....   | <b>26</b> |
| <b>1.7 JUSTIFICATIVA</b> .....  | <b>28</b> |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....  | <b>29</b> |
| 2.1 Objetivo Geral.....   | 29        |
| 2.2 Objetivos Específicos.....  | 29        |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | <b>31</b> |
| 3.1 Áreas geográficas e locais de estudo.....   | 31        |
| 3.2 Obtenção e processamento dos isolados.....  | 31        |
| 3.3 Identificação dos isolados por MALDI-TOF MS .....   | 34        |
| 3.4 Determinação espectrofométrica das taxas de crescimento e atividade urease.....                                       | 34        |
| 3.5 Análise da produção de melanina.....  | 35        |
| 3.6 Análise microscópicas e de imunofluorescência.....  | 36        |
| 3.7 Avaliação da diversidade capsular.....  | 37        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 3.8      | Análise da secreção de GXM pelos diferentes isolados.....   | 37        |
| 3.9      | Concentração Inibitória Mínima (CIM).....   | 38        |
| 4.0      | Análises estatística.....   | 39        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS</b> .....   | <b>40</b> |
| 4.1      | Identificação de isolados ambientais <i>C. neoformans</i> .....   | 40        |
| 4.2      | Isolados ambientais.....  | 42        |
| 4.3      | Caracterização fenotípica de isolados de <i>C. neoformans</i> .....   | 44        |
| 4.4      | Diversidade de polissacarídeos nos isolados de <i>C. neoformans</i> .....   | 48        |
| 4.5      | Análise de correlação das dimensões celulares, tamanho da cápsula, detecção de GXM extracelular, reconhecimento sorológico da superfície celular e atividade da urease..... | 53        |
| 4.6      | Determinação da CIM para isolados ambientais.....   | 55        |
| <b>5</b> | <b>DISCUSSÃO</b> .....  | <b>58</b> |
| <b>6</b> | <b>PERSPECTIVAS</b> .....   | <b>69</b> |
| <b>7</b> | <b>CONCLUSÕES</b> .....   | <b>70</b> |
| <b>8</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....   | <b>71</b> |
| <b>9</b> | <b>APÊNDICE</b> .....   | <b>92</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                    |   |    |
|--------------------|---|----|
| <b>Figura 1 -</b>  | Número de casos de criptococose em Roraima no período de 2005 a 2019 (junho) associados ao HIV.   | 7  |
| <b>Figura 2 -</b>  | Vesículas contendo GXM formadas no citoplasma atravessando a parede celular para a cápsula.   | 12 |
| <b>Figura 3 -</b>  | Síntese de melanina utilizando L-3,4-dihidroxifenilalanina como substrato.  | 15 |
| <b>Figura 4 -</b>  | Princípios gerais da tecnologia de espectrometria de massa por ionização/dessorção de matriz assistida por laser por tempo de voo (MALDI-TOF).                      | 26 |
| <b>Figura 5 -</b>  | Aspecto de colônias marrons sugestivas de <i>Cryptococcus</i> spp. isoladas em placas de Petri após processamento das excretas.                                     | 33 |
| <b>Figura 6 -</b>  | Ilustração geográfica dos locais de coleta das amostras identificadas de <i>C. neoformans</i> .   | 42 |
| <b>Figura 7 -</b>  | Melanização dos 23 isolados de <i>C. neoformans</i> VNI e cepa controle H99 / ATCC 208821 em ágar níger.  | 45 |
| <b>Figura 8 -</b>  | Taxas de crescimento dos 23 isolados de <i>C. neoformans</i> do estado de Roraima, Brasil, em comparação com a cepa padrão H99 / ATCC 208821.                       | 46 |
| <b>Figura 9 -</b>  | Determinação da atividade da urease em sobrenadantes de cultura dos isolados de <i>C. neoformans</i> de Roraima, em comparação com a cepa padrão H99 / ATCC 208821. | 47 |
| <b>Figura 10 -</b> | Exame microscópico dos isolados de <i>C. neoformans</i> de Roraima  |    |

|   |    |
|---|----|
| e da cepa padrão H99 / ATCC 208821.   | 49 |
| <b>Figura 11</b> - Determinação quantitativa das dimensões celulares nos isolados ambientais de <i>C. neoformans</i> em comparação com a cepa padrão H99 / ATCC 208821. | 51 |
| <b>Figura 12</b> - Determinação quantitativa da reatividade do mAb 18B7 com os isolados de <i>C. neoformans</i> .   | 52 |
| <b>Figura 13</b> - Detecção de GXM extracelular por ELISA.  | 53 |
| <b>Figura 14</b> - Análises de correlação dos diferentes parâmetros medidos no presente estudo.   | 55 |

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Caracterização por MALDI-TOF MS dos isolados provenientes dos municípios Bonfim, Pacaraima e Boa Vista, Roraima. 41
- Tabela 2** - Número de amostras de excretas de pombos positivas para *C. neoformans* genótipo VNI, coletadas nos dois municípios e na capital de Roraima. 43
- Tabela 3** - Densidade de *Cryptococcus* spp em amostras de excretas de pombos positivas para o fungo, coletadas no estado de Roraima. 44
- Tabela 4** - Concentração inibitória mínima (CIM) para anfotericina B e fluconazol dos 23 isolados de *C. neoformans* coletados nos municípios Pacaraima, Bonfim e Boa Vista, Roraima 56

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC: *American Type Cultura Collection*

AIDS: *Acquired Immunodeficiency Syndrome*

AmB: Anfotericina B

ASD: ágar dextrose sabouraud

CIM: concentração inibitória mínima

*C. gatti: Cryptococcus gatti*

*C. neoformans: Cryptococcus neoformans*

CLSI: *Clinical and Laboratory Standarts Institute*

DATASUS: Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde

DMSO: dimetilsulfóxido

EUCAST: *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing*

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

et. al.: *et aluminii*

FCZ: fluconazol

FIOCRUZ-RJ: Fundação Oswaldo Cruz- Rio de Janeiro

g: grama

GXMGal: glucuronoxilomanogalactana

GXM: glucoroxilomanana

HIV: *Human Immunodeficiency Virus*

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

L: litro

LCR: líquido cefalorraquidiano

MALDI-TOF: *Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization-Time of flight*

M: média

Mo: moda

Mg: miligrama

mL: mililitro

MOPS: ácido morfolinopropanosulfônico

NSA: ágar semente níger

OD: densidade óptica

PAMPs: Padrões Moleculares Associados a Patógenos



PBS: *Phosphate buffered saline*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

pH: potencial hidrogeniônico

PRRs: Receptores de Reconhecimento de Padrão

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

RPM: rotação por minuto

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SIH-SUS: Sistema de Informações Hospitalares do SUS

SNC: sistema nervoso central

UFC: unidades formadoras de colônias

UV: radiação ultravioleta

YPD: extrato de levedura-peptona-dextrose

µg: micrograma

µL: microlitros

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Infecções fúngicas

A incidência das micoses invasivas está em contínua evolução, principalmente em pacientes com HIV/AIDS (1). Vários surtos recentes chamaram a atenção de autoridades de saúde pública para a importância das infecções fúngicas invasivas (IFIs) como um problema de saúde pública. Os surtos de IFI são causados por muitos gêneros de patógenos fúngicos e estão associados a inúmeros fatores (2).

As doenças fúngicas matam mais de 1,5 milhão de pessoas por ano e afetam mais de um bilhão de indivíduos (3). Contudo, elas ainda são um tema negligenciado pelas autoridades de saúde pública, embora a maioria das mortes por doenças fúngicas sejam evitáveis (4,5). O diagnóstico precoce e preciso permite a implementação imediata de terapia antifúngica. No entanto, os fármacos são frequentemente ineficientes ou estão indisponíveis, levando à morte ou a sintomas crônicos graves. Estimativas globais indicam que anualmente é realizado o diagnóstico de 3.000.000 casos de aspergilose pulmonar crônica, 223.100 casos de meningite criptocócica correlacionada com HIV/AIDS, 700.000 casos de candidíase invasiva e 100.000 casos de disseminação por histoplasmoze (3). O gênero *Cryptococcus* causa isoladamente 220.000 mortes de seres humanos a cada ano (6).

Patógenos fúngicos oportunistas podem causar uma gama de doenças em humanos. Para isso os fungos exibem uma diversidade de mecanismos para manter a resiliência fisiológica e criar uma variação genética que leva à seleção e disseminação de patógenos fúngicos resistentes (7). O aquecimento global pode selecionar espécies ambientais que adquiriram capacidade de termotolerância, fator esse de necessidade fundamental para a multiplicação e patogênese no hospedeiro humano. Além disso os fungos desenvolveram diversos mecanismos de virulência que os tornam capazes de habitar e de se desenvolver no hospedeiro (8). Esses fenômenos de virulência incluem a secreção de superóxido dismutase, essencial na proteção contra radicais livres tóxicos (9), fosfolipases, que facilitam a proliferação intracelular no hospedeiro (10), e urease, que favorece o crescimento intracelular e disseminação para diferentes órgãos e tecidos (11).

As infecções fúngicas contribuem substancialmente para a morbidade e mortalidade em humanos. No Brasil, dados epidemiológicos são diretamente afetados pelo fato de que fungos não são incluídos como causadores de doenças de notificação compulsória. Nesse cenário, a geração de vacinas e novas classes de antifúngicos com menor toxicidade e custos é fundamental. De fato, a geração de conhecimento ligada às infecções ocasionadas por fungos em humanos está atrasada em relação às doenças ocasionadas por outros patógenos (5). Ademais, precisamos entender melhor as respostas imunes do hospedeiro frente aos patógenos fúngicos, bem como a base genética humana para o aumento da sensibilidade de alguns indivíduos às infecções ocasionadas por fungos (12).

### 1.1.1 Membros do gênero *Cryptococcus* e a Criptococose

O primeiro relato de criptococose humana foi apresentado em 1894 pelo patologista Otto Busse e pelo médico Abraham Buschke, num quadro de granuloma crônico do osso tibial de uma mulher jovem. Entretanto, a criptococose humana se tornou reconhecida como uma grave ameaça à saúde na década de 1980 com o início da pandemia da AIDS, pois essa infecção fúngica se tornara uma doença definidora do prognóstico de AIDS em pacientes com reduzida função de linfócitos (13), com contagem de linfócitos TCD4 < 100 células/ $\mu$ L (14).

O gênero *Cryptococcus* compreende atualmente 30 espécies pertencentes ao filo Basidiomycota, porém os agentes etiológicos da criptococose em humanos são *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gatti* (15,16). A criptococose é uma micose sistêmica oportunista potencialmente letal em humanos e animais. São infecções emergentes e cosmopolitas, sendo facilmente distinguidas de outros gêneros de leveduras patogênicas pela presença de cápsula polissacarídica e de outros fatores de virulência, como a produção de melanina, urease e capacidade de crescimento a 37°C. O ciclo da infecção ocorre pela inalação de propágulos dispersos no ambiente e subsequente disseminação para o sistema nervoso central, causando a forma mais grave, a meningoencefalite (17,18).

Geralmente a infecção pulmonar é assintomática após inalação dos propágulos de *Cryptococcus* spp. (19). A doença pulmonar pode ser similar à gripe ou pneumonia branda, com controle pelo sistema imunológico em imunocompetentes ou infecção latente assintomática (20). Em

imunocomprometidos, por meio da corrente sanguínea, essa infecção latente pode acarretar em uma disseminação para outros tecidos, principalmente o sistema nervoso central (SNC). Uma vez estabelecida no SNC, a criptococose causa uma infecção grave nas meninges e tecido cerebral (21). A doença é frequentemente acompanhada por um aumento da pressão intracraniana, e com a ausência de diagnóstico clínico e tratamento tardio ou ineficaz, a infecção se torna fatal (13,22).

A criptococose causada por *C. neoformans* está diretamente relacionada com pacientes imunocomprometidos, principalmente com AIDS, enquanto infecções causadas por *C. gattii* são mais frequentemente relatadas em pacientes imunocompetentes (23). Nos últimos anos, foram reportados casos pouco usuais de infecções em pacientes sem diagnóstico para HIV, causados por espécies, como *C. laurentii*, *C. liquefaciens* e *C. albidus* (24).

As leveduras do gênero *Cryptococcus* são encapsuladas com morfologia esférica a oval possuindo diâmetro de 2 a 20  $\mu\text{m}$  (25). São saprófitas do ambiente, sendo isoladas principalmente de excretas de aves e ocos de árvores (26). A morfologia atípica melhor caracterizada das células de *Cryptococcus* spp. é a observada em célula Titã (27). Estas células possuem mais de 12  $\mu\text{m}$  de diâmetro (excluindo a cápsula) possuindo cápsulas altamente reticuladas, com parede celular espessa (28). Essa alteração morfológica é considerada um importante mecanismo de virulência no gênero (29,30).

A cápsula polissacarídica é um fator importante na virulência de *C. neoformans*, esse polissacarídeo é reconhecido e clivado pelas quitinases do hospedeiro, o que induz uma falha da resposta imune adaptativa, resultando no

aprimoramento e adaptação genética ao ambiente estressante do hospedeiro, e assim uma maior sobrevivência da levedura, por conta da dificuldade da ação das células fagocitárias do sistema imune do hospedeiro (30).

A meningite criptocócica é a doença mais grave acometendo hospedeiros imunocomprometidos em todo o mundo. Anualmente, estima-se que haja 200.000 casos de meningite criptocócica. Desse montante, foram estimados recentemente mais de 3.400 casos por ano nos Estados Unidos. No entanto, apesar da baixa incidência, a mortalidade por ano é estimada entre 20 a 30%, mesmo com a terapia antifúngica (31).

A maioria dos casos de criptococose ocorre na África Subsaariana. Estimativas indicam que mais de 170.000 pessoas adultas podem morrer anualmente nesta região de meningite criptocócica associada ao HIV (32). Nos países da América Latina, estima-se que em cada 1.000 pacientes com AIDS, ocorram 34 casos de criptococose anualmente (33). Em países em desenvolvimento, esta micose sistêmica foi identificada como uma das infecções fúngicas mais letais neste grupo de pacientes. Mesmo com o tratamento antirretroviral as taxas de mortalidade variam entre 42 a 60% (34). Na Tailândia por exemplo, a mortalidade da criptococose é estimada em 43%, com tempo médio de sobrevivência de 14 dias (35). No Brasil, a meningite criptocócica foi a primeira doença definidora de AIDS em 69% dos pacientes (36).

### 1.1.2 Classificação de *Cryptococcus*

O complexo *Cryptococcus* compreende cinco sorotipos e duas espécies principais, *C. neoformans* e *C. gatti* (37). Com base nas reações de aglutinação dos antígenos capsulares através de anticorpos, os sorotipos capsulares denominados A e D e o híbrido AD pertencem a *C. neoformans*, enquanto os sorotipos B e C são classificados como *C. gatti* (33, 34). Os cinco sorotipos se dividem em oito tipos moleculares: VNI e VNII (sorotipo A), VNIII (sorotipo AD), e VNIV (sorotipo D) para *C. neoformans*; VGI, VGII, VGIII e VGIV (sorotipos B e C) para *C. gatti* (35,36).

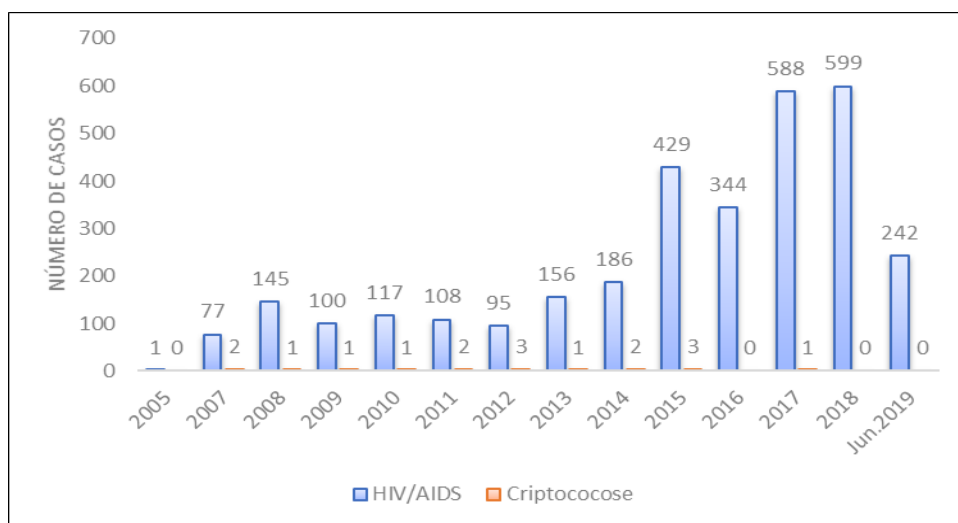
Foi recentemente proposta uma reclassificação das espécies patogênicas de *Cryptococcus* em sete espécies: *C. neoformans*, *C. deneoformans*, *C. gatii*, *C. bacillisporus*, *C. deuterogatii*, *C. tetragatii* e *C. decagatii* (16). No entanto, não há consenso para a utilização de nova nomenclatura, permanecendo o uso do “complexo de espécies *C. neoformans* e *C. gatii*” como uma estratégia prática ao invés de se criar mais espécies, uma vez que a adoção da nomenclatura proposta poderia dissociar a taxonomia da prática clínica (40).

*C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) é a variedade de *C. neoformans* mais comumente isolada em amostras clínicas e ambientais em todo o mundo, exceto nos países do norte da Europa, onde o sorotipo D é responsável por 50% dos isolados (41,42). O sorotipo híbrido AD foi isolado de amostras clínica e ambiental na América do Norte e Europa (43). Estudos preliminares sobre a infecção por *C. gatii* revelou prevalência nas regiões tropicais e subtropicais, com baixa frequência em zonas temperadas (18). Até recentemente, supunha-se que *C. gatii* estava restrito a áreas tropicais e subtropicais. Porém, foi relatado em 2002 um surto na

ilha de Vancouver no Canadá, mudando as suposições sobre o padrão de distribuição dessa espécie (44).

No Brasil, foi realizada a sorotipagem de 467 isolados de *C. neoformans* através de fontes clínicas e ambientais, obtidas através de padrões regionais e de hospedeiros, demonstrando que o sorotipo A também é o mais prevalente (77,95%), seguido pelo sorotipo B (18,2%), AD (1.3%), D (0.4%) e C (0.2%) (45).

Em Roraima, dados obtidos através do DATASUS e SINAN (242) revelaram 17 casos de criptococose durante os anos de 2005 a 2019 (junho). Desse total de casos registrados, 0,53% (17/3.187) eram coinfectados com HIV/AIDS e criptococose (Figura 1). Neste intervalo de tempo de 14 anos, os pacientes coinfectados eram predominantemente do sexo masculino (82,3%), com 7 óbitos (41% dos casos) (242).



**Figura 1.** Número de casos de criptococose em Roraima no período de 2005 a 2019 (junho) associados ao HIV. Fonte: Secretaria de Vigilância à Saúde, Ministério da Saúde, 2019 (242).



## 1.2 Interação fungo-ambiente

A natureza sapróbia de *C. neoformans* é conhecida desde 1894 quando Sanfelice isolou o agente a partir de suco de pêssego fermentado (46). Posteriormente, em 1951, Emmons realizou importante descoberta da epidemiologia de *C. neoformans* a partir de raspados de terra contendo excretas de pombos (47). Desde então a literatura tem reportado o isolamento de *C. neoformans* de diferentes fontes naturais em vários continentes, evidenciando sua ampla distribuição em zonas tropicais e temperadas tais como na África e Ásia (48) Oceania (49), Europa (50), América do Norte (51) e América do Sul (52,53).

*C. neoformans* são fungos ubíquos de distribuição mundial. Seus habitats naturais são tipicamente excretas de aves, ficando muito bem estabelecido que os excrementos de pássaros protegem os fungos da radiação ultravioleta do sol. Além disso, o crescimento de leveduras é facilitado devido às altas concentrações de uréia (54).

No Brasil, diversos autores descrevem o isolamento de *C. neoformans* em fontes ambientais como solo, excretas e ninhos de pombos em centros urbanos distribuídos por Amazonas, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (52,55–62). O isolamento de *C. neoformans* também foi relatado em outras fontes ambientais, como poeira domiciliar no Rio de Janeiro (63). Em Manaus foi constatada a presença de *C. neoformans* e *C. gatti* provenientes de detritos de vegetais e oco de árvores (62). Os estudos ambientais

dos agentes da criptococose em Roraima datam de 1997 com o isolamento de *C. neoformans* da fonte clássica, excreta de pombos, na capital Boa Vista, RR (64). O primeiro relato de *C. gattii* em Roraima resultou de isolamento a partir de madeira em decomposição na cavidade (oco) de uma árvore viva, *Guettarda acreana*, na Estação Ecológica de Maracá, RR (57).

### **1.3 Fatores de virulência do gênero *Cryptococcus***

*C. neoformans* apresenta fenótipos específicos que conferem vantagem para sobrevivência e proliferação no organismo do hospedeiro. Uma hipótese para a seleção e evolução de certos fatores de virulência é o escape à predação por organismos de solo, como nematoides e amebas (66). A infecção de *C. neoformans* e *C. gattii* ocorre de forma acidental em hospedeiros humanos e animais (67). Como já mencionado, infecção é adquirida pela inalação de esporos ou conídios ressecados do ambiente, que colonizam primeiramente o pulmão, podendo permanecer livres em tecidos ou fluídos corporais como também dentro de células fagocíticas (67,68). Notavelmente, a taxa de replicação intracelular do *C. neoformans* está correlacionada com sua virulência (69,70).

Os fungos devem atender a quatro critérios para causar doença em humanos: 1) crescimento na temperatura corpórea humana, 2) penetração através das barreiras gerais como pele, mucosa e membranas, 3) adesão tecidual e 4) resistência às defesas imunológicas (70).

Os fatores de virulência aumentam o grau de patogenicidade de um microrganismo. *C. neoformans* possui vários fatores de virulência, mas a sua capacidade de causar dano ao hospedeiro está diretamente relacionada com o estado de imunodepressão ou imunocompetência do hospedeiro (71). Estudos sobre os fatores de virulência são fundamentais para compreender a patobiologia dessa levedura e permitirão a identificação de novos alvos para a terapia antifúngica (72).

Compreendem os principais fatores de virulência de *C. neoformans* a formação de cápsula polissacarídica, produção de melanina, urease e termotolerância (73).

### 1.3.1 Cápsula polissacarídica

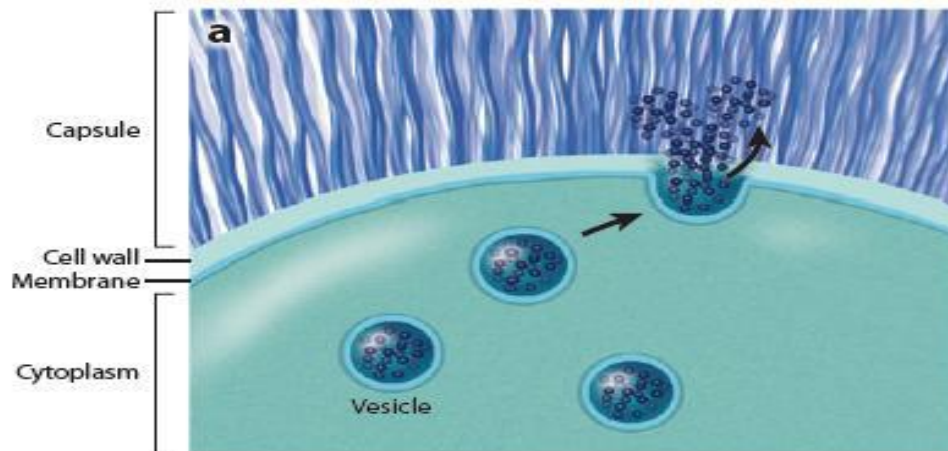
A cápsula presente em *C. neoformans* é o fator de virulência mais importante, contribuindo com aproximadamente 25% do potencial patogênico (74,75). Ela é composta principalmente de dois polissacarídeos, a glucuronoxilomana (GXM) e glucuronoxilomanogalactana (GXMGal) (76). A cápsula também pode conter outros componentes secundários, como manoproteínas (75,77).

A estrutura da cápsula é complexa e varia de acordo com as condições ambientais, incluindo fibras ramificadas que se ligam à parede celular por ligações não covalentes (77,78). O polissacarídeo mais estudado no gênero *C. neoformans* é a GXM, responsável por cerca de 90% da composição capsular (77). Diferenças

estruturais nesse polissacarídeo classificam esses patógenos nos sorotipos encontrados nas espécies *C. neoformans* e *C. gattii*. A cápsula é induzida por diversas condições, como mudanças de pH, elevados níveis de CO<sub>2</sub> (79) e privação de ferro (77).

A GXM também possui numerosas propriedades imunomoduladoras que facilitam a sobrevivência do *C. neoformans* no hospedeiro (80). O fungo é normalmente reconhecido pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) das células do sistema imune do hospedeiro, que se ligam aos padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs). Esse processo induz eventos de imunidade inata, como fagocitose e produção de citocinas. PAMPs comuns de fungos incluem componentes da parede celular, como  $\beta$ -glucanas ou mananas (81,82). A cápsula de *C. neoformans* pode mascarar o reconhecimento de PAMPs (83,84).

A GXM é sintetizada no complexo de Golgi (85) e transportada através da parede celular por meio de vesículas (86). Esse polissacarídeo é constitutivamente secretado para o meio extracelular (87). A figura 2 esquematiza a transposição da vesícula e liberação de GXM para a cápsula.



**Figura 2.** Vesículas contendo GXM formadas no citoplasma atravessando a parede celular para atingir a cápsula. Fonte (79).

Em *C. neoformans* a formação da cápsula depende da função de 4 genes, denominados *CAP64*, *CAP60*, *CAP59* e *CAP10* (88). A deleção de qualquer destes genes resulta em cepas mutantes acapsuladas e avirulentas. A reintrodução de uma cópia funcional de um dos genes restaura a produção da cápsula e a virulência fúngica (89).

### 1.3.2 Termotolerância

A termotolerância é um atributo de virulência crucial para fungos patogênicos para humanos e animais mamíferos (90). A grande maioria das espécies de fungos possui crescimento ótimo entre 25 e 35°C. Apenas alguns fungos apresentam termotolerância, que consiste na capacidade de crescer entre 35 e 40°C. A termotolerância permite que *C. neoformans* possa crescer e proliferar em temperaturas entre 35–39°C. Essa característica é um pré-requisito para que o

microrganismo seja capaz de proliferar e provocar doença em hospedeiros mamíferos (91). A termotolerância em *C. neoformans* envolve a expressão de diferentes genes, do qual a calcineurina fosfatase dependente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina e da proteína Ras1. Isolados mutantes hipovirulentos incapazes de expressar tais proteínas, possuem problemas de crescimento *in vitro* a 37°C (92,93).

### 1.3.3 Atividade urease

A urease é um importante fator de virulência em *C. neoformans* (94). Uma das características que diferenciam *C. neoformans* de outras leveduras é a sua capacidade de produzir urease (95,96). Cepas de *C. neoformans* urease negativas raramente foram isoladas de pacientes ou do meio ambiente (96). Cox e colaboradores (97), demonstraram que mutantes para o gene *URE1* de *C. neoformans* são hipovirulentos. Essa enzima promove acumulação de células dendríticas imaturas e uma resposta imune Th2 não-protetora no pulmão, ocasionando a persistência de *C. neoformans* nos alvéolos do hospedeiro (96,98).

A urease é uma metaloenzima que catalisa a hidrólise da uréia em amônia e carbamato (99). A amônia gerada pela atividade ureolítica pode servir como fonte de nitrogênio (11). Além de seu papel nutricional, atividade ureolítica aumenta a invasão de *C. neoformans* no sistema nervoso central, promovendo o sequestro da levedura nos microcapilares da barreira hematoencefálica (94). Foi ainda sugerido que a amônia gerada pela atividade da urease torna-se tóxica para as células endoteliais microvasculares (100,101). A amônia mediada pela urease também

pode neutralizar qualquer microambiente ácido e assim ajudar os patógenos a sobreviverem ao pH severo do fagolisossomo no interior das células hospedeiras (94).

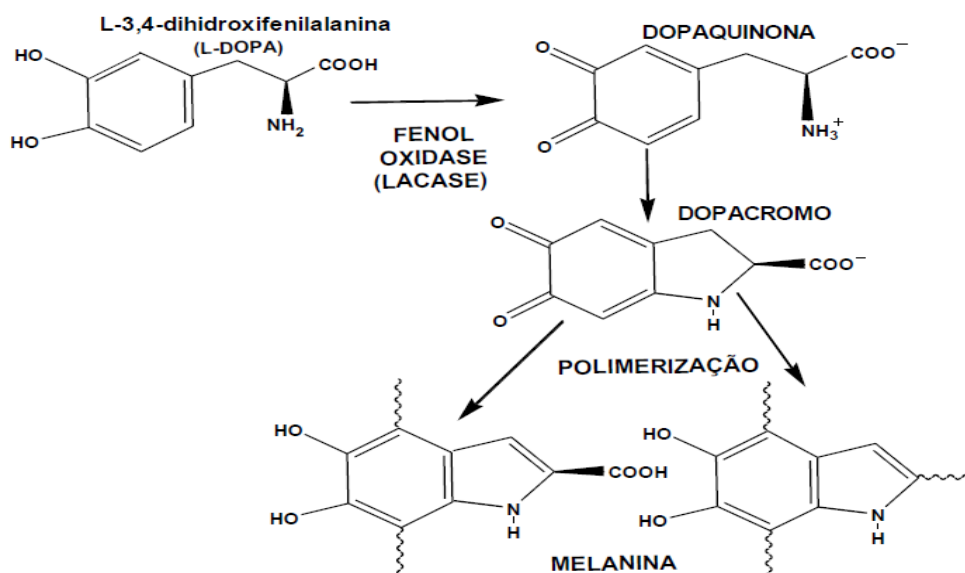
#### 1.3.4 Melanina

Muitas espécies de fungos, bactérias patogênicas e helmintos produzem melanina. A melanização foi descrita como fator de virulência em *C. neoformans*, uma vez que a perda deste atributo leva a uma virulência atenuada (102,103). A melanina é um pigmento escuro hidrofóbico de alto peso molecular, carregado negativamente, insolúvel em fluídos aquosos ou orgânicos (104). São macromoléculas sintetizadas por polimerização oxidativa de compostos fenólicos ou indólicos (Figura 3).

A pigmentação também é necessária para fuga predatória e sobrevivência no ambiente (105), proteção contra radiação de alta energia (13), degradação enzimática e toxicidade de metais pesados, ação de antifúngicos e também contra a resposta imune do hospedeiro (102). Os fungos sintetizam melanina constitutivamente, outros, facultativamente, como é o caso de *C. neoformans* que o faz na presença dos precursores apropriados (106). Em meio contendo substratos fenólicos, como L-dopa, células de *C. neoformans* sintetizam e acumulam pigmento de coloração marrom escuro (107). Esse pigmento se acumula na parede celular do fungo e pode contribuir com a sobrevivência deste e manutenção da integridade da parede (107,108). Vários estudos forneceram evidências convincentes de que a

infecção por *C. neoformans* é acompanhada pela formação de melanina na parede celular (109).

O neurotropismo de *C. neoformans* pode ser explicado em parte pela capacidade do fungo de converter catecolaminas em melanina. Catecolaminas incluem moléculas como epinefrina, norepinefrina e dopamina, que funcionam como neurotransmissores do SNC (110). Essas moléculas são encontradas em concentrações significativas em tecidos de mamíferos (111).



**Figura 3.** Síntese de melanina utilizando L-3,4-dihidroxi-fenilalanina como substrato. Adaptado de (110).

A síntese de melanina em *Cryptococcus* depende da atividade das fenol-oxidases conhecidas como lacases. *C. neoformans* apresenta dois genes codificadores de lacase, *LAC1* e *LAC2* (112,113). Ambos tem sua expressão induzida por privação de glicose (112,114). *LAC1* é o principal responsável pela síntese de melanina. O gene *LAC2* é adjacente ao *LAC1* no genoma e apresenta



75% de identidade de nucleotídeos com *LAC1*, mutantes para o gene *LAC2* apresentaram apenas um modesto atraso na produção de melanina (112).

#### **1.4 Agentes antifúngicos**

O desenvolvimento de agentes antifúngicos é desafiador, considerando que os fungos são eucarióticos, como seus hospedeiros. Conseqüentemente, muitas drogas antifúngicas causam ações deletérias em células do hospedeiro, podendo acarretar uma série de efeitos colaterais durante o tratamento de infecções fúngicas (115,116).

Atualmente existem quatro classes principais de agentes antifúngicos: Azóis, equinocandinas, polienos e análogos de pirimidina. Estes são utilizados para administração oral, tópica ou intravenosa no tratamento de infecções ocasionadas por vários gêneros fúngicos (116,117). Uma quinta classe, as alilaminas, são utilizados apenas para o tratamento de infecções superficiais (118). Os antifúngicos agem basicamente sobre 4 alvos: integridade da membrana (polienos) e parede celular (equinocandinas), biossíntese do ergosterol (azóis e alilaminas) e síntese do DNA (análogos pirimidínicos) (119–121). A terapia contra a criptococose inclui a anfotericina B (AmB) e 5-fluorocitosina (5-FC) pelo menos duas semanas, seguidas por fluconazol (FZ) por oito semanas (122).

A AmB é um polieno natural obtido da bactéria *Streptomyces nodosus*. O fármaco se liga ao ergosterol na membrana celular do fungo, aumentando a permeabilidade celular a prótons e cátions monovalentes, tais como o potássio

(123). A AmB induz efeitos colaterais, principalmente em rins e fígado (124). A nefrotoxicidade, detectada pelo o aumento de duas vezes no nível basal de creatinina sanguínea, ocorre em mais de 30% dos pacientes (125). O fármaco induz vasoconstrição na arteríola renal aferente, além de desequilíbrio e permeabilidade tubular, causando redução da filtração glomerular, acidose tubular e perda de potássio e magnésio (123). Foram desenvolvidas formulações de AmB, com menor toxicidade, incluindo o complexo lipídico de AmB (126), dispersão coloidal da AmB (127) e AmB lipossomal (128). Todas estas formulações de AmB são usadas no tratamento das micoses sistêmicas e são administradas por via intravenosa (129,130).

A 5FC é uma pirimidina fluoretada, descoberta em 1957, com ação antifúngica descrita apenas em 1963, em modelo murino de candidíase (131). O fármaco, ativo contra fungos leveduriformes, foi introduzido na terapêutica humana em 1968 (131).

A 5FC é transportada pela citosina-permease e é convertida no antimetabólito 5-fluorouracila (5-FU) nas células dos fungos, e este é incorporado no monofosfato de ácido 5-fluorodesoxiuridílico, que interfere com a atividade da timidilato sintetase e na síntese de DNA (132). Trata-se portanto, de uma pirimidina fluorada sintética que age através da inibição da síntese de DNA (123). A 5FC é raramente administrada sozinha. Este fármaco é administrado juntamente com a AmB em casos de infecção com *Cryptococcus* (133).

Os efeitos colaterais graves da 5FC incluem hepatotoxicidade e disfunções na medula óssea. Na maioria dos pacientes, esses efeitos colaterais são

dependentes da concentração do fármaco e possivelmente evitáveis com monitoramento cuidadoso para manter as concentrações de 5FC em <100mg/L, (134,135). Lamentavelmente, esta droga não está disponível para uso no mercado brasileiro (136).

Na década de 1980, surgiram os derivados azólicos, um grupo de compostos sintéticos com amplo espectro de atividade antifúngica. São classificados de acordo com o número de átomos de nitrogênio no anel azólico em imidazóis, com dois (ex. miconazol e cetoconazol) e triazóis com três átomos de Nitrogênio (ex. itraconazol, fluconazol e voriconazol) (137). Interferem na síntese do ergosterol, bloqueando a enzima lanosterol-14  $\alpha$ -demetilase, interrompendo a conversão do lanosterol em ergosterol. Esta propriedade dos azóis altera a função da membrana celular aumentando sua permeabilidade (123,129,138). Em geral, os triazóis demonstram amplo espectro de atividade antifúngica e reduzida toxicidade quando comparados com os imidazóis (139).

O fluconazol exibe uma excelente absorção após administração oral (140). Apresenta ainda alta solubilidade em água, podendo ser administrado por via endovenosa em pacientes gravemente doentes (141). No liquor, o fluconazol pode atingir níveis de quase 70% de biodisponibilidade, sendo eliminado principalmente pela urina do paciente (123). O uso indiscriminado da classe dos azóis levou ao surgimento de resistência em gêneros fúngicos antes suscetíveis (142,143).

As equinocandinas são os antifúngicos mais recentemente descobertos (115,144). Apesar de aplicáveis para o tratamento de infecções causadas por *Candida* e *Aspergillus*, esses fármacos não tem ação anti-*Cryptococcus* (145).

A disponibilidade de novos antifúngicos nos últimos anos ofereceu aos médicos mais opções, aumentando o uso desses compostos não apenas para o tratamento quando a infecção for diagnóstica, mas também como tratamento profilático, empírico ou preventivo. Por outro lado, o aumento do uso de antifúngicos induziu uma pressão seletiva mais alta sobre as cepas de fungos e a resistência emergiu de duas maneiras principais: várias espécies desenvolveram resistência secundária e espécies suscetíveis foram substituídas por resistentes, alterando a epidemiologia das infecções fúngicas (146).

#### 1.4.1 Mecanismos de resistência e testes de susceptibilidade a antifúngicos

A resistência antifúngica é um processo evolutivo baseado em seleção de microrganismos que melhoram sua capacidade de sobreviver e crescer na presença de drogas. A evolução da resistência contra agentes antimicrobianos é onipresente na natureza e os microrganismos evoluem com várias estratégias para combater a ação das drogas (118). Do ponto de vista clínico, a resistência ao medicamento ocorre quando a terapia medicamentosa apropriada não é eficaz, causando persistência ou progressão de uma infecção (147).

Para combater os efeitos fungicida ou fungistático de todas as classes antifúngicas, as células fúngicas geralmente devem se adaptar à presença de drogas tóxicas usando três principais estratégias de sobrevivência: diminuição da concentração efetiva da droga, alteração do alvo da droga e modificações do metabolismo para desviar os efeitos tóxicos exercidos pelos agentes antifúngicos

(118). Contudo, outros fatores de resistência já foram descritos, incluindo super expressão da proteína alvo por modificação da região promotora do gene codificador, expressão de sistemas de efluxo e respostas pleiotrópicas a medicamentos (148). A resistência aos antifúngicos pode ocorrer também devida a formação de biofilmes, que consistem em uma densa camada de células diferenciadas com uma capa de matriz extracelular, diminuindo a eficácia de alguns antifúngicos durante o processo de infecção (149).

Embora os mecanismos envolvidos no processo de resistência a antifúngicos ainda sejam pouco conhecidos, um dos principais mecanismos de resistência dos fungos, consiste na alteração da composição de lipídeos da sua membrana celular. O ergosterol presente como constituinte da membrana citoplasmática dá lugar a formação de outros esteróis (150). Alterações na constituição de ergosterol, ou mesmo uma deficiência deste lipídeo presente na membrana celular do fungo, tem sido associada a mecanismo de resistência à AmB. Estas deficiências poderiam ser resultado de mutações nos genes que codificam algumas enzimas envolvidas na síntese do ergosterol. Defeitos no gene *ERG3* que codifica C-5-esterol desaturase (enzima que catalisa precursores do ergosterol) foram relatados por conduzir o acúmulo de outros esteróis precursores deste esterol (151).

Estudo realizado por Sokol-Anderson *et al.* (152) demonstraram que os efeitos letais de AmB em *C. albicans* estão associados a dano celular oxidativo, semelhante as adaptações observada nas bactérias. Portanto, a administração da AmB no tratamento seria capaz de competir pelo sítio de ação, e desta forma

facilitar para a seleção de estirpes resistentes e conseqüentemente diminuição da resposta ao tratamento. Essa resistência pode acontecer devido a uma produção maior da enzima catalase pelo fungo, que atua diretamente em substâncias oxidativas, diminuindo o sítio de ação oxidativa da AmB (153).

Sanguinetti *et al.* (154), descreveram em *C. neoformans* o gene denominado *AFR1* (*antifungal resistance 1*), que codifica um transportador ABC envolvido na resistência *in vitro* desse microrganismo ao fluconazol. Várias investigações têm mostrado o aumento do número de recidivas de meningite criptocócica em pacientes com AIDS associados com o aumento de resistência ao fluconazol (155,156).

Pfaller *et al.* (157), avaliaram as tendências mundiais de suscetibilidade de isolados de *C. neoformans* a antifúngicos no período de 1990 a 2004, tendo sido testados 1.811 isolados de 100 centros médicos de 5 regiões geográficas diferentes. Este estudo constatou que a resistência *in vitro* frente aos agentes antifúngicos utilizados no tratamento da criptococose nas regiões da África, América Latina, Europa e do Pacífico são mais sensíveis ao fluconazol que isolados da América do Norte, não demonstrando aumento no período de 15 anos avaliados.

No Brasil, alguns estudos demonstram a existência de isolados de *C. neoformans* menos susceptíveis a itraconazol e fluconazol (158). A maioria dos trabalhos sobre susceptibilidade antifúngica não discrimina entre espécies e sorotipos de *Cryptococcus*, mas os poucos trabalhos têm evidenciado menor suscetibilidade *in vitro* de *C. gattii* em relação a *C. neoformans* (167–169).

A necessidade de testes de suscetibilidade antifúngica (TSA) vem crescendo constantemente nas últimas duas décadas (162,163). Os testes de suscetibilidade a antifúngicos disponíveis atualmente podem facilitar no tratamento de pacientes com exposição antifúngica prévia como na determinação da resistência ou de uma resistência cruzada (164). Estes testes podem ser usados não somente na pesquisa de sensibilidade aos antimicrobianos, como também na busca por novos fármacos a partir da verificação de sua atividade antifúngica, como extratos vegetais e de substâncias puras (165).

Metodologias convencionais para teste de suscetibilidade a antifúngicos são utilizados com protocolos de referência propostos pelo *The Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (166), anteriormente conhecido como *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) e *The Antifungal Susceptibility testing Sub-committee of the European on Antimicrobial Susceptibility Testing* (AFST-EUCAST), que desenvolveu protocolo baseado na primeira edição do documento do NCCLS M27 – A (162). O AFST-EUCAST foi formado em 1997 e, em 2008, publicou o Padrão de Teste de Suscetibilidade para leveduras (incluindo *Cryptococcus*). Este padrão foi atualizado em 2016 pelo E.Def 7.3, documentos do método E.Def 9,2 e E.Def 9.3. (167). Todos esses padrões estão disponíveis no site (<http://www.eucast.org>).

Em 1985 o CLSI formou um subcomitê de Teste de Suscetibilidade Antifúngica que publicou em 1997 o documento M27A “Método aprovado de Referência para a Suscetibilidade Antifúngica de Teste de levedura diluição em Caldo” (168). Este documento definiu a referência de cepas com faixas de

Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) e Pontos de Corte (PC) para alguns antifúngicos e sua ação contra leveduras como *Candida* e *Cryptococcus* (169). Desde então, várias atualizações foram publicadas (170). Para fungos filamentosos, o primeiro documento foi publicado em 2002, denominado Método de Referência para o Teste de Suscetibilidade Antifúngica de Diluição em Caldo para fungos filamentosos (170).

Diferenças entre ambos padrões são encontrados principalmente no tamanho do inóculo, tempo de incubação e composição do meio. Apesar dessas diferenças, os resultados obtidos pelos dois métodos são em geral semelhantes, indicando que a metodologia não coloca nenhum obstáculo para obtenção de padrões uniformes para testes de suscetibilidade antifúngica para leveduras (171). CLSI e EUCAST incluem especificidades para *Cryptococcus*. No CLSI, a recomendação é realizar a leitura do CIM para *Cryptococcus* após 70 a 74 horas de incubação (em contraste de 24-48 horas para *Candida*), e o protocolo do EUCAST recomenda a incubação das placas a 30°C caso o controle de crescimento não atinja densidade óptica de 0,2 a 35°C (169). As modificações mais importantes introduzidas pelo protocolo EUCAST incluem tamanho do inóculo de  $1-5 \times 10^5$  UFC/ml<sup>-1</sup> (até 100 vezes maior do que no método CLSI) e a suplementação do meio de cultura para uma concentração final de D-glicose à 2% (sendo 10 vezes maior do que no método CLSI) (172).

Para *Cryptococcus* spp. a resistência antifúngica é difícil de ser definida em laboratório, devido à ausência de pontos de corte estabelecidos para interpretar os resultados. Quando os pontos de interrupção da suscetibilidade clínica estão



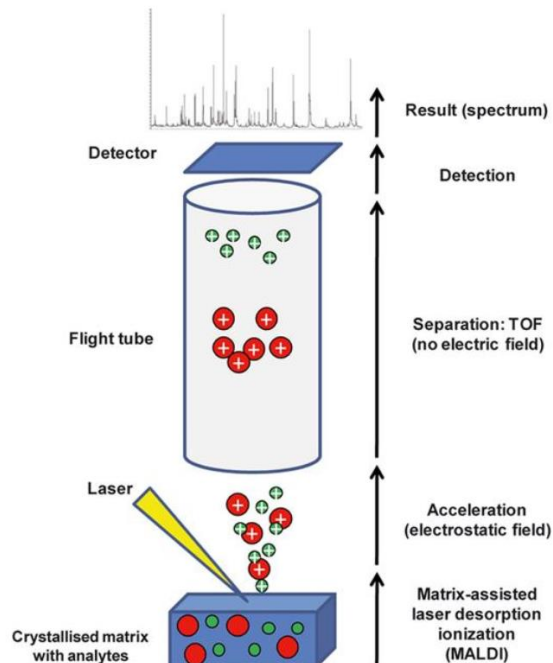
ausentes, o *Epidemiological Cutoff Values* (ECV) fornece meios sensíveis para detectar a resistência emergente ao antimicrobianos (173). No entanto, esses valores de ECV variaram quando cada genótipo foi avaliado separadamente. (174). Não há, portanto, consenso sobre o ponto de corte para definir sensibilidade e resistência frente aos diferentes compostos antifúngicos (175,176). Apesar disso, alguns autores propõem ECV para *C. neoformans* VNI, incluindo AmB, 0,5µg/mL; 5FC, 8µg/mL; fluconazol, 8µg/mL; itraconazol, 0,25µg/mL; posaconazol, 0,25µg/mL; e voriconazol 0,25µg/mL. Para *C. gattii* (VGII) são propostos: 1,0µg/mL para AmB; 16µg/mL para 5FC; 32µg/mL para fluconazol; 0,5µg/mL para itraconazol; 0,5µg/mL para posaconazol; e 0,25µg/mL para voriconazol (177,178).

### **1.5 Identificação de fungos por MALDI-TOF** (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time Flight Mass Spectrometry*)

Na última década, os laboratórios de microbiologia clínica passaram por mudanças revolucionárias no modo pelo qual os microrganismos são identificados. As técnicas tradicionais e demoradas foram complementadas, ainda que a análise morfológica continue a ser importante. Métodos moleculares, como a espectrometria de massa (MS) (179), estão se tornando essenciais na maioria dos laboratórios de microbiologia clínica em todo o mundo (180,181). A tecnologia promove a identificação precisa, rápida e barata de microrganismos isolados de amostras clínicas (182). A técnica de espectrometria de massa com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz - MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) e analisador de massas do tipo tempo-de-voo - TOF (*Time-*

*of-Flight*), MS vem mostrando precisão e reprodutibilidade na identificação de patógenos (183).

O uso da tecnologia de EM ganhou destaque em 1987 (184), pela ionização de macromoléculas biológicas por laser ao utilizar uma matriz composta por partículas de cobalto e glicerol. Na análise por MALDI-TOF, a matriz absorve a energia do laser e ocorre a ionização controlada de proteínas microbianas. As moléculas ionizadas na forma gasosa são posteriormente aceleradas através de um campo elétrico e depois migram em um tubo de vácuo a uma velocidade proporcional à razão massa carga ( $m/z$ ). Um detector no final do tubo de vácuo detecta as moléculas de migração ionizadas e mede seu tempo de voo, sendo que os menores íons chegam antes ao detector. Um espectro bruto é pré-processado e comparado com um banco de dados de espectros de referência. Com base na semelhança do espectro da amostra com o espectro de referência, o microrganismo é identificado como pertencente ao mesmo gênero, espécie ou subespécie do espectro de referência (185–187). Os princípios da MALDI TOF MS estão ilustrados na Figura 4 (187).



**Figura 4.** Princípios gerais da tecnologia de espectrometria de massa por ionização/dessorção de matriz assistida por laser por tempo de voo (MALDI-TOF). (adaptado de (187)).

## 1.6 Área geográfica de estudos

Nas regiões Norte e Nordeste do Brasil ocorrem casos de criptococose em indivíduos com ou sem evidência de imunodepressão, incluindo jovens e crianças, com elevada morbidade e letalidade (SIH-SUS, 2012). Dessa forma, a criptococose vem sendo considerada como um grave problema de saúde pública. Não há, entretanto, relatos sobre o potencial patogênico de isolados ambientais de *Cryptococcus* em Roraima.

Entre os estados brasileiros, Roraima é o menos populoso (0,3% da população brasileira total). Segundo os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2019 (188), estimou-se para o Estado de Roraima 605.761

habitantes. O estado está situado na região Norte do país, tendo como capital Boa Vista, sendo o estado mais setentrional da federação, ocupando uma área aproximada de 224,3 mil km<sup>2</sup>. Em Roraima predomina o clima similar ao dos estados da região Norte que abrigam a Floresta Amazônica, consistindo basicamente de clima equatorial e tropical úmido, com temperatura média oscilando entre 20°C e 30°C. Visualmente, o lavrado roraimense lembra o cerrado e constitui uma região de 43.281,519 km<sup>2</sup> equivalente a 19,3% do estado. Predomina em nove dos quinze municípios de Roraima, com destaque para a capital Boa Vista, localizada dentro do domínio do lavrado (savana), (188).

Da população total do estado de Roraima, 399.213 (65%) concentra-se na capital Boa Vista (189). O município de Bonfim, possui o oitavo maior número de população do estado, com 12.409 habitantes (2,04%) (189). Bonfim encontra-se ainda conurbada à cidade guianense de Lethem, constituindo uma aglomeração urbana transnacional. As duas manchas urbanas encontram-se separadas apenas pelo rio Tacutú, sobre o qual passa a ponte Brasil-Guiana, liga-se a Boa Vista pela BR-401, a uma distância de 125 km. Pacaraima é conhecida como "Polo Norte de Roraima", pelo fato de suas temperaturas serem mais baixas que no resto do estado, em função de sua altitude de 920m (município mais alto do estado). Sua população é estimada em 17.401 habitantes (189). O acesso à cidade de Pacaraima se dá pela rodovia BR-174. A distância até Boa Vista é de cerca de 220 quilômetros.

## 1.7 JUSTIFICATIVA

Mundialmente a criptococose ocasionada por *C. neoformans* atinge predominantemente indivíduos imunocomprometidos. A América Latina ocupa o terceiro lugar entre as regiões afetadas, com aproximadamente 54.400 casos por ano. A maioria dos casos diagnosticados de meningite criptocócica ocorrem em pacientes com AIDS (33). No Brasil, a prevalência da criptococose está subestimada, pois não é uma doença de notificação obrigatória, além de recursos financeiros para diagnóstico laboratorial serem limitados em muitas regiões (190).

A infecção por *Cryptococcus* é de difícil tratamento e apresenta recidivas frequentes, mesmo com uso de antifúngicos. Os sobreviventes muitas vezes apresentam graves sequelas. O tratamento desta micose no Brasil está baseado na utilização de AmB isoladamente ou associada ao fluconazol, devido à falta de disponibilidade da 5FC no mercado brasileiro.

Devido à inexistência de estudos que descrevem a produção de fatores de virulência em isolados de *C. neoformans* em Roraima, nosso estudo se propõe a investigar a arquitetura da superfície celular, fatores de virulência e testes de suscetibilidade a antifúngicos em isolados ambientais obtidas nesse estado, visando assim contribuir para o entendimento sobre como membros ambientais do complexo *C. neoformans* podem causar danos ao hospedeiro humano. Espera-se assim que o presente estudo tenha relevância sanitária para a região, pois existem poucos estudos sobre o potencial patogênico de microrganismos ambientais no estado de Roraima.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Estudar a presença de *C. neoformans* em excretas de pombos na capital Boa Vista e região fronteira dos municípios de Bonfim e Paracaraima, estado de Roraima, caracterizando os isolados ambientais quanto ao tipo molecular, suscetibilidade a antifúngicos e produção de fatores de virulência.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a carga de *Cryptococcus* em fezes de pombos.
- Isolar e identificar as espécies e os genótipos dos isolados ambientais de *Cryptococcus* nessas amostras;
- Avaliar a capacidade de melanização e produção de urease nos isolados;
- Caracterizar nos isolados elementos fenotípicos associados à virulência, como tamanho do corpo celular, dimensões capsulares e crescimento à 30 e 37 graus;
- Avaliar a capacidade de produção de GXM capsular e extracelular das leveduras através de citometria de fluxo, microscopia de fluorescência e ELISA;
- Determinar para os isolados a CIM para fluconazol e anfotericina B utilizando o teste de microdiluição em caldo recomendado pelo EUCAST;

- Analisar as correlações entre a produção dos diferentes fatores de virulência aqui estudados.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Áreas geográficas e locais de estudo**

O ambiente amostral do estudo está centrado na capital Boa Vista e na região de fronteira internacional do estado de Roraima, que compreende o município de Pacaraima, nordeste do estado, localizado na fronteira com a Venezuela, e o município de Bonfim, nordeste do estado, que faz fronteira com a cidade de Lethen, na Guiana. Como critérios de inclusão, foram selecionados os respectivos municípios por fazerem fronteira com o Estado e por abrigarem as aves (pombos). Não foram considerados no estudo, amostra de excretas inferiores a 1 grama de peso.

#### **3.2 Obtenção e processamento dos isolados**

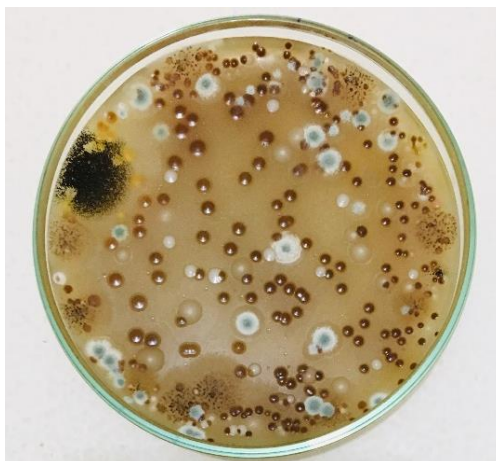
No período de março, novembro e dezembro de 2016 e no mês de janeiro de 2017, as amostras de excretas ressecadas das aves foram colhidas nos três municípios do estado que possuíam maior número de pombos urbanos. As amostras foram colhidas em órgãos governamentais, instituições de ensino, bancos, praças e locais privados. Todos os locais investigados possuem grande fluxo de pessoas diariamente.

Com o auxílio de máscara e luvas, foram utilizados frascos e espátulas estéreis para coleta do material diretamente obtidas de raspado de excretas do solo, paredes e ninho. As amostras foram transportadas ao Laboratório de



Microbiologia da Faculdades Cathedral e processadas imediatamente. Foram considerados como alvo do estudo locais que continham quantidades superiores a 1g de excretas secas de pombos.

Primeiramente, as excretas foram maceradas com auxílio de gral e pistilo estéril e, na sequência, 1g de amostra foi transferido para tubo estéril e homogeneizado por cinco minutos em 10 mL de solução salina estéril contendo 0,5 mg/mL de gentamicina. As amostras foram posteriormente mantidas em repouso por 30 minutos. Dessa suspensão foram utilizados 0,1 mL para inoculação em meio sólido contendo extrato de sementes de niger (NSA) suplementado com cloranfenicol (0,2 mg/mL) usando alça de Drigalski estéril. O material foi incubado a 25°C por até sete dias com observação diária para detecção de crescimento fúngico (191,192). Colônias pigmentadas de consistência mucoide (Figura 5) foram selecionadas para avaliação micromorfológica. Aquelas que continham células compatíveis com as de *C. neoformans* ou outras espécies do gênero (redondas, ovais com ou sem brotamento), foram armazenadas e identificadas individualmente em tubos com meio ágar Sabouraud Dextrose (ASD) a 4°C. Quando a amostra continha várias colônias que apresentavam características fenotípicas sugestivas para o gênero *Cryptococcus*, foi selecionada aleatoriamente uma colônia para análise por Espectrometria de Massa MALDI-TOF.



**Figura 5.** Aspecto de colônias marrons sugestivas de *Cryptococcus* spp. isoladas em placas de Petri após processamento das excretas.

A determinação das unidades formadoras de colônias (UFC) típicas de *Cryptococcus* spp. (Figura 5) se deu pela homogeneização de cada 1 grama de excreta amostrada em 10 mL de água destilada estéril, sendo que 0,1 mL foi utilizado para semeadura das amostras em placas de NSA que foram incubadas a 30°C por até 5 dias para posterior contagem de UFCs. O valor obtido foi multiplicado por 100 pela diluição previamente realizada (1 grama excreta por amostra diluída em 10 mL água destilada estéril), para expressar um resultado final em UFC/grama de excreta.

Para ampliar o número de isolados obtidos nesse estudo, foram adicionados aos testes, seis isolados de *C. neoformans* obtidos de excretas de pombos em diferentes locais de Boa Vista. Esses seis isolados, identificados como 3Pb3, 5Pb2, 19Pb4, 23Pb2, 32Pb1 e RR2605, fazem parte do acervo de culturas de leveduras do Laboratório de Micologia do Centro de Estudos da Biodiversidade da Universidade Federal de Roraima, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Silvana Fortes.

### 3.3 Identificação dos isolados por MALDI-TOF MS

A extração de proteínas de cada isolado foi realizada através da transferência de uma alça de biomassa da levedura para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL contendo 300 µl de água purificada. A suspensão obtida foi misturada com 900 µl de etanol absoluto e centrifugada novamente por um minuto. Os sedimentos foram secos em temperatura ambiente e suspensos em 50 µl de ácido fórmico (70%). Adicionou-se um volume equivalente de acetonitrila e a mistura foi novamente centrifugada por 2 minutos a 13.000 rpm. Amostras de sobrenadante (1 µl, quadruplicatas) foram colocadas em uma lâmina descartável composta por um suporte de polipropileno com uma camada de aço inoxidável (bioMérieux). Após a secagem ao ar, cada amostra foi coberta com 1 µl de matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) (bioMérieux). As amostras foram analisadas pelo Vitek MS (bioMérieux) e os espectros foram gerados utilizando o software Launchpad versão 2.8 (bioMérieux). A análise dos dados foi realizada com o software Saramis Premium (versão 4.12, bioMérieux). Valores de pontuação acima de 1000 pontos se correlacionam com um nível de confiança de 99,9% de identificação. A identificação de genótipos foi baseada em um estudo recente usando MALDI-TOF MS para discriminar entre genótipos de *Cryptococcus* (193).

### 3.4 Determinação espectrofotométrica das taxas de crescimento

Todos os isolados foram cultivados a 30°C durante 24 horas sob agitação (200 rpm) em meio Sabouraud líquido (10g/L de peptona e 20g/L dextrose). As

células foram lavadas duas vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril e ajustadas para uma densidade óptica ( $\lambda=600$ ) de 0,01, para posterior incubação a temperatura de 30°C ou 37°C no mesmo meio, sob agitação (200 rpm). Alíquotas de cada cultura foram coletadas em 4, 6, 8, 10, 12, 24 e 48 horas para avaliação da densidade óptica.

### 3.4 Determinação espectrofotométrica de atividade da urease

Para determinação da atividade da urease, as células foram cultivadas por 24 horas em meio Sabouraud líquido e lavadas por três vezes com PBS. Após esse período, os isolados foram transferidos para meio de cultura contendo uréia (4 g/100 mL), extrato de levedura (0,02 g/100 mL), vermelho de fenol (0,002 g/100mL),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,273 g/100 mL) e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,285 g/100 mL). Após 24 horas de incubação a 37°C no meio acima descrito, foram medidas as absorbâncias em comprimento de onda equivalente a 540nm, conforme descrito por Kwon-Chung *et al.* (95).

### 3.5 Análise da produção de melanina

As cepas foram cultivadas em placas contendo meio Sabouraud por 48 horas em temperatura ambiente. Em seguida, duas colônias de cada isolado foram selecionadas, lavadas com 2 mL PBS 1x e então com o auxílio de uma alça de platina (20  $\mu\text{l}$ ) foram semeadas por estrias na superfície em meio (NSA) contendo 50g/L *Guizotia abyssinica*, glucose (1g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1g/L), creatinina (1g/L), agar

(15g/L), pH 6.5 (194). As placas foram incubadas por 48 horas em temperatura de 37°C ao abrigo da luz. A pigmentação foi avaliada diariamente por análise visual das células por 72 horas. Como controle negativo, foi utilizada a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* RSY 113.

### 3.6 Análises microscópicas e de imunofluorescência.

Os diferentes isolados foram cultivados em meio Sabouraud líquido por 16 horas a 30°C sob agitação (200 rpm). Após crescimento, as células de cada isolado foram lavadas por três vezes em PBS e incubadas em meio mínimo quimicamente definido composto de glicose (15mM), MgSO<sub>4</sub> (10mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (29,4mM), glicina (13mM) e tiamina-HCl (3M), pH 5,5, durante três dias nas mesmas condições descritas acima. As células foram colhidas por centrifugação, lavadas em PBS e fixadas em paraformaldeído a 4% (1h à temperatura ambiente). As células foram então bloqueadas com albumina de soro bovino a 1% (BSA) em PBS (1 hora, 37°C) e incubadas com o anticorpo monoclonal anti-GXM 18B7 (IgG1) (mAb18B7 a 10mg/mL, 1 hora, 37°C), gentilmente doado pelo Dr. Arturo Casadevall (Universidade Johns Hopkins). As células foram novamente lavadas e incubadas com um anticorpo secundário anti-mouse IgG, conjugado com Alexa Fluor 488 (10 µg/mL, 1 hora, 37°C; Invitrogen, EUA). As células também foram coradas com calcofluor white (5µg/mL, 1 hora, 37°C; Invitrogen, EUA) para visualização da parede celular. As células foram novamente lavadas com PBS e contracoradas com tinta nanquim para medição capsular. Todas as imagens foram adquiridas

usando um microscópio óptico de fluorescência Axioplan 2 (Zeiss, Alemanha) com uma objetiva de imersão de 63X. Para determinação quantitativa das dimensões celulares, foram determinados os diâmetros das células e capsulas contra-coradas com tinta Nanquim (100 medições para cada isolado) utilizando o software Fiji. Em seguida as imagens obtidas foram processadas utilizando o software analySIS (Soft ImageJ Sistem) e as dimensões capsulares foram expressas como a razão entre os diâmetros capsular e celular, enquanto os diâmetros celulares foram expressos em  $\mu\text{m}$ .

### 3.7 Avaliação da diversidade capsular

Células fúngicas foram cultivadas em YPD (extrato de levedura-peptona-dextrose) por 48 horas a 30°C e transferidas para RPMI para posterior incubação por 24 horas a 37°C para indução de secreção de GXM, conforme descrito por O'meara & Alspaugh (195). As células fúngicas foram recolhidas e preparadas para coloração com mAb 18B7 como descrito acima para análise de imunofluorescência. As células foram analisadas por citometria de fluxo em citômetro FACS II, como recentemente descrito pelo nosso grupo (196). Os dados foram processados com o software FACSDiva Version, versão 6.1.3.

### 3.8 Análise da secreção de GXM pelos diferentes isolados

A detecção de GXM livre em sobrenadante de culturas dos diferentes isolados foi realizada por ELISA como previamente descrito por Casadevall *et al.*

(197). A metodologia e condições de crescimento e incubação das colônias, foram as mesmas realizados no ítem (3.7). Resumidamente, os sobrenadantes foram recolhidos por centrifugação e utilizados para sensibilizar os poços de uma placa de poliestireno de 96 poços por 1 hora a 37°C. Após a sensibilização, a placa foi lavada com PBS e então bloqueada com 1% de albumina bovina sérica (BSA), por mais 1 hora a 37°C. Após bloqueio, foi adicionado aos poços o anticorpo monoclonal 18B7 em 1% BSA em PBS e a placa incubada por mais uma h a 37°C. Em seguida a placa foi lavada com PBS e os poços foram incubados com o anticorpo secundário IgG1 de cabra anti-camundongo conjugado à fosfatase alcalina por 1 hora a 37°C. A reação foi revelada após a adição de hexaidrato de p-nitrofenil fosfato dissódico, seguido de leitura espectrofotométrica a 405 nm. GXM purificada (198), foi utilizada para elaboração de curvas padrão para a quantificação da GXM livre nos sobrenadantes de cultura dos diferentes isolados.

### 3.9 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para anfotericina B (AMB) e fluconazol (FLZ), foi realizado o teste de sensibilidade antifúngica seguindo o protocolo preconizado pelo EUCAST (Método de referência E.Def 7.3.1) (167). Para isso, os isolados de *C. neoformans* foram cultivados em placas de ágar Sabouraud por 48 horas a 30°C e então uma suspensão de  $5 \times 10^5$  células/mL foi preparada em H<sub>2</sub>O destilada. As placas de sensibilidade antifúngica foram preparadas com uma faixa de concentrações de AmB de 16 a 0,03 µg/mL e

de FLZ de 64 a 0,12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em RPMI 2x concentrado, suplementado com 4% de glicose, tamponado a pH 7,0 com MOPS 165 mM. 100  $\mu\text{L}$  dos inóculos preparados foram utilizados para inocular as placas de antifúngico, que após a inoculação atingem as concentrações desejadas de RPMI 1x suplementado com 2% de glicose. Após serem inoculadas, as placas foram incubadas a 35°C sem agitação por 48 horas. Em seguida, mediu-se a DO a 530 nm e definiu-se a CIM como a concentração antifúngica capaz de inibir 90% (para AMB) e 50% (para FLZ) do crescimento em comparação com o poço controle sem antifúngico. As cepas *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Candida krusei* (ATCC 6258) foram utilizadas como controle de qualidade nos experimentos conforme preconizado pelo EUCAST.

### 3.9 Análises estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism (La Jolla, CA). As comparações entre os grupos foram submetidas à análise de variância one-way (ANOVA) e as comparações pareadas foram realizadas com o teste *t* de Student. Testes de correlação foram também realizados com o software GraphPad Prism para cálculo dos valores de  $R^2$  e P. Valores significativos de correlação foram definidos usando o corte de 0,05. A coleta de dados para análise de correlação incluiu valores médios de GXM livre no sobrenadante de cultura ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), atividade da urease (unidades de absorbância), diâmetros do corpo celular ( $\mu\text{m}$ ), tamanho da cápsula ( $\mu\text{m}$ ) e reatividade sorológica da cápsula com mAb 18B7



(unidades de fluorescência obtidas a partir de análise de citometria de fluxo) de 24 pares XY (23 isolados mais a cepa padrão H99 / ATCC 208821).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Identificação de isolados ambientais *C. neoformans*

Devido à importância clínica de *C. neoformans* genótipo VNI na região Norte do Brasil (199,200) e sua associação com excretas de pombos (18,201–203), as amostras selecionadas para este estudo foram limitadas a excrementos de pombos.

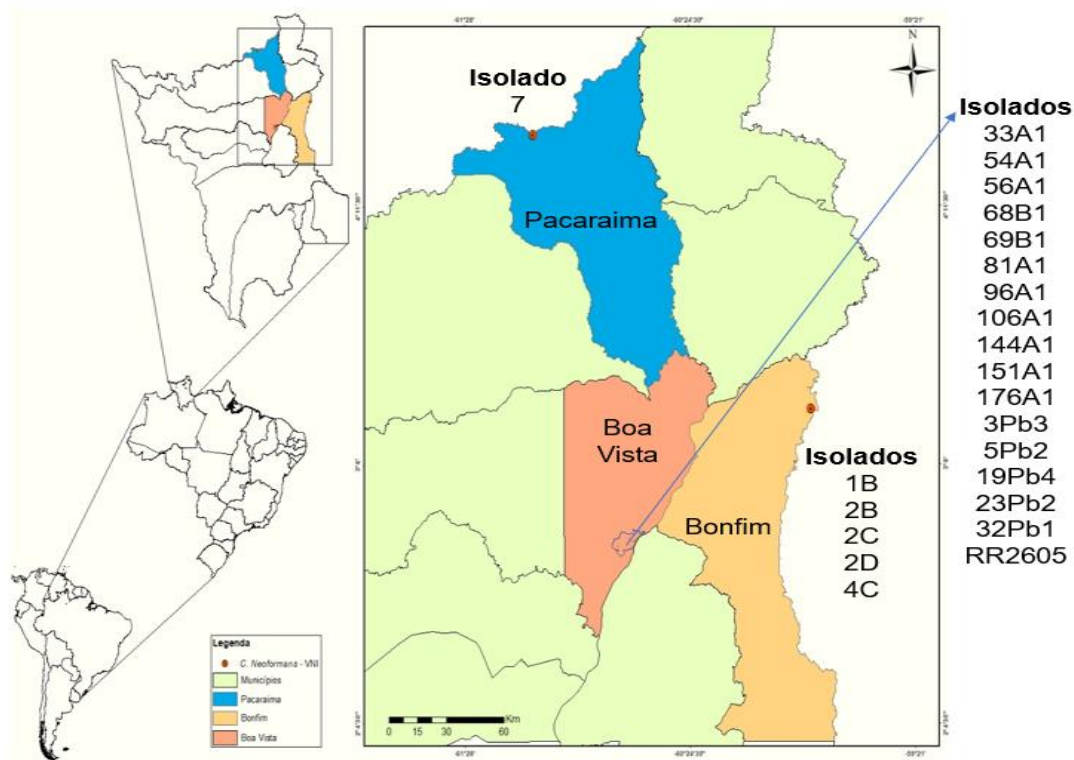
Os tipos moleculares foram identificados por MALDI-TOF MS. Todos os isolados (17 positivos) corresponderam ao *C. neoformans* VNI. Como mencionado anteriormente, foram incluídos em nosso trabalho seis isolados, que após análise genotípica por MALDI-TOF MS foram identificados como *C. neoformans* VNI: 3Pb3, 5b2, 19Pb4, 23Pb2, 32Pb1 e RR 2605, pertencentes a micoteca da UFRR (Tabela 1).

**Tabela 1.** Caracterização por MALDI-TOF MS dos isolados provenientes dos municípios Bonfim, Pacaraima e Boa Vista, Roraima\*.

| Isolado | Local                   | Gênero e espécie     | Genótipo | Range (%) | Score (range) |
|---------|-------------------------|----------------------|----------|-----------|---------------|
| 1B      | Hemocentro              | <i>C. neoformans</i> | VNI      | 99,90     | 1224          |
| 2B      | Hemocentro              | <i>C. neoformans</i> | VNI      | 99,90     | 1235          |
| 2C      | Hemocentro              | <i>C. neoformans</i> | VNI      | 99,90     | 1235          |
| 2D      | Hemocentro              | <i>C. neoformans</i> | VNI      | 99,90     | 1240          |
| 4C      | Hemocentro              | <i>C. neoformans</i> | VNI      | 99,90     | 1245          |
| 7       | Batlhão Polícia Militar | <i>C. neoformans</i> | VNI      | 99,90     | 1225          |
| 33A1    | Escola Pública          | <i>C. neoformans</i> | VNI      | 99,90     | 1221          |
| 54A1    | Praça                   | <i>C. neoformans</i> | VNI      | 99,90     | 1237          |
| 56A1    | Órgão público           | <i>C. neoformans</i> | VNI      | 99,90     | 1250          |
| 68B1    | Órgão público           | <i>C. neoformans</i> | VNI      | 99,90     | 1250          |
| 69A1    | Órgão público           | <i>C. neoformans</i> | VNI      | 99,90     | 1246          |
| 81A1    | Órgão público           | <i>C. neoformans</i> | VNI      | 99,90     | 1250          |
| 96A1    | Órgão público           | <i>C. neoformans</i> | VNI      | 99,90     | 1230          |
| 106A1   | Escola publica          | <i>C. neoformans</i> | VNI      | 99,90     | 1243          |
| 144A1   | Órgão particular        | <i>C. neoformans</i> | VNI      | 99,90     | 1242          |
| 151A1   | Órgão particular        | <i>C. neoformans</i> | VNI      | 99,90     | 1235          |
| 176A1   | Órgão público           | <i>C. neoformans</i> | VNI      | 99,90     | 1232          |
| 3Pb3    | Acervo laboratório Ufr  | <i>C. neoformans</i> | VNI      | 99,90     | 1368          |
| 5Pb2    | Acervo laboratório Ufr  | <i>C. neoformans</i> | VNI      | 99,90     | 1249          |
| 19Pb4   | Acervo laboratório Ufr  | <i>C. neoformans</i> | VNI      | 99,90     | 1158          |
| 23Pb2   | Acervo laboratório Ufr  | <i>C. neoformans</i> | VNI      | 99,90     | 1221          |
| 32Bp1   | Acervo laboratório Ufr  | <i>C. neoformans</i> | VNI      | 99,90     | 1235          |
| RR2605  | Acervo laboratório Ufr  | <i>C. neoformans</i> | VNI      | 99,90     | 1236          |

\*A identificação dos fungos baseou-se nos dados fornecidos pelo software SARAMIS Premium (bioMérieux) com uma base de dados validada de *C. neoformans* e *C. gattii* perfis espectrais de genótipos (Siqueira *et al.*, (193). Valores de pontuação acima de 1000 pontos se correlacionam com um nível de confiança de 99,9% de identificação. Nenhum dos isolados teve escores acima de 1000 pontos para outros genótipos.

As taxas de identificação de positividade para *C. neoformans* VNI nas amostras coletadas nos municípios foram variadas, incluindo 25% nas amostras obtidas na cidade de Bonfim (5 de 20 isolados), 12,5% em Pacaraima (1 de 8 isolados) e 6% na capital Boa Vista (11 de 184 isolados) (Figura 6).



**Figura 6.** Ilustração geográfica dos locais de coleta das amostras identificadas de *C. neoformans*. As cidades onde foram realizadas as coletas (Pacaraima, Boa Vista e Bonfim) estão em destaque, sendo utilizados nesse estudo 1 isolado de Pacaraima, 5 isolados de Bonfim e 17 isolados de Boa Vista, conforme informado no mapa.

#### 4.2 Isolados ambientais

Ressalta-se que a quantidade de excretas encontradas durante as coletas foi muito variável, apresentando baixa quantidade em áreas privadas em comparação com áreas públicas. Foi possível observar no momento da coleta que

em muitos locais de propriedade particular, eram realizadas limpezas diárias dos ambientes, não ocorrendo acúmulo de excretas, apesar da presença dos pombos. Na capital Boa Vista, por se tratar de uma maior área urbana (e com várias opções de abrigo), como consequência observamos uma maior quantidade de aves e pontos de coletas. Podemos observar uma diferença expressiva na quantidade de amostras coletadas (184) quando comparado aos dois municípios fronteiriços, Bonfim e Pacaraima, com 20 e 8 amostras coletadas respectivamente (Tabela 2).

**Tabela 2.** Número de amostras de excretas de pombos positivas para *C. neoformans* genótipo VNI, coletadas nos dois municípios e na capital de Roraima.

| Locais                   | Procedência | Nº de amostras | Genótipo VNI | % Positividade Genótipo VNI |
|--------------------------|-------------|----------------|--------------|-----------------------------|
| Hospital estadual        | Bonfim      | 20             | 5            | 25                          |
| Batalhão Polícia Militar | Pacaraima   | 8              | 1            | 12,5                        |
| Escolas Públicas         |             | 45             | 2            | 4,4                         |
| Órgãos Particulares      | Boa Vista   | 30             | 1            | 3,3                         |
| Órgãos Públicos          |             | 44             | 5            | 11,3                        |
| Praças                   |             | 65             | 3            | 4,6                         |
| Subtotal Boa Vista       | -           | 184            | 11           | 5,9                         |
| Total nos Municípios     | 3           | 212            | 17           | 8                           |

A quantidade de UFC/g de excretas variou de 100 a 12.700 (média de 2.686) entre as amostras coletadas nos três municípios do estado de Roraima. Durante o período das coletas, foi possível identificar que em locais onde possuíam uma maior quantidade de excretas e ninhos havia uma correlação com uma maior contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de aspecto superficial brilhante, liso, com consistência cremosa a mucoide, e coloração que variou de

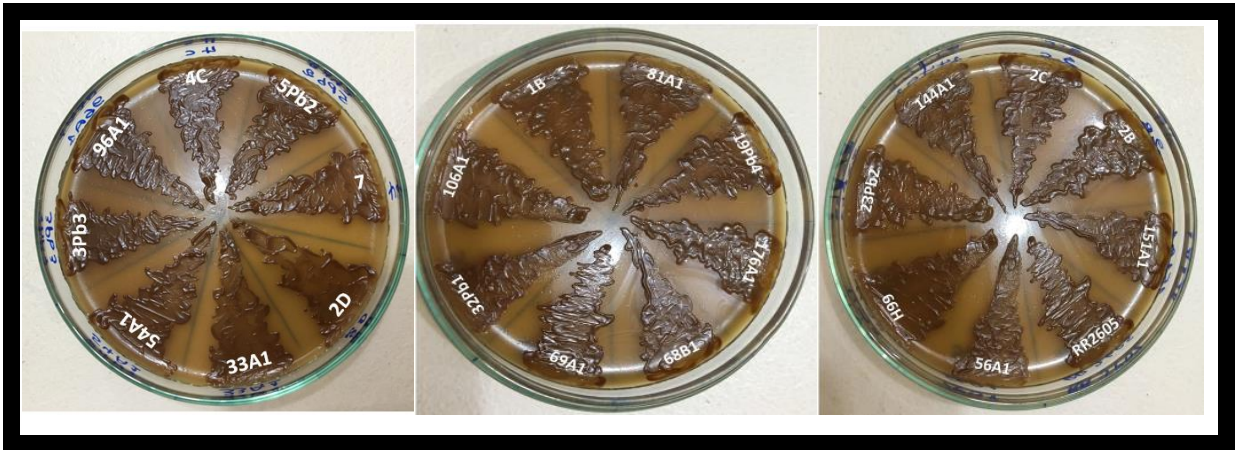
bege a marrom claro e ao marrom escuro, características de crescimento de *C. neoformans* (Tabela 3).

**Tabela 3.** Densidade de *Cryptococcus* spp. em amostras de excretas de pombos, coletadas no estado de Roraima.

| <b>Amostra</b> | <b>Local isolamento</b> | <b>No de colônias observadas</b> | <b>Densidade (UFC/g)</b> |
|----------------|-------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| 1B             | Bonfim                  | 8                                | 800                      |
| 2B             | Bonfim                  | 3                                | 300                      |
| 2C             | Bonfim                  | 11                               | 1.100                    |
| 2D             | Bonfim                  | 9                                | 900                      |
| 4C             | Bonfim                  | 12                               | 1.200                    |
| 7              | Pacaraima               | 1                                | 100                      |
| 33A1           | Boa Vista               | 23                               | 2.300                    |
| 54A1           | Boa Vista               | 12                               | 1.200                    |
| 56A1           | Boa Vista               | 21                               | 2.100                    |
| 68B1           | Boa Vista               | 4                                | 400                      |
| 69A1           | Boa Vista               | 19                               | 1.900                    |
| 81A1           | Boa Vista               | 17                               | 1.700                    |
| 96A1           | Boa Vista               | 34                               | 3.400                    |
| 106A1          | Boa Vista               | 63                               | 6.300                    |
| 144A1          | Boa Vista               | 2                                | 200                      |
| 151A1          | Boa Vista               | 127                              | 12.700                   |
| 176A1          | Boa Vista               | 43                               | 4.300                    |
| 3Pb3           | Boa Vista               | 13                               | 1.300                    |
| 5Pb2           | Boa Vista               | 35                               | 3.500                    |
| 19Pb4          | Boa Vista               | 81                               | 8.100                    |
| 23Pb2          | Boa Vista               | 67                               | 6.700                    |
| 32Bp1          | Boa Vista               | 1                                | 100                      |
| RR 2605        | Boa Vista               | 12                               | 1.200                    |

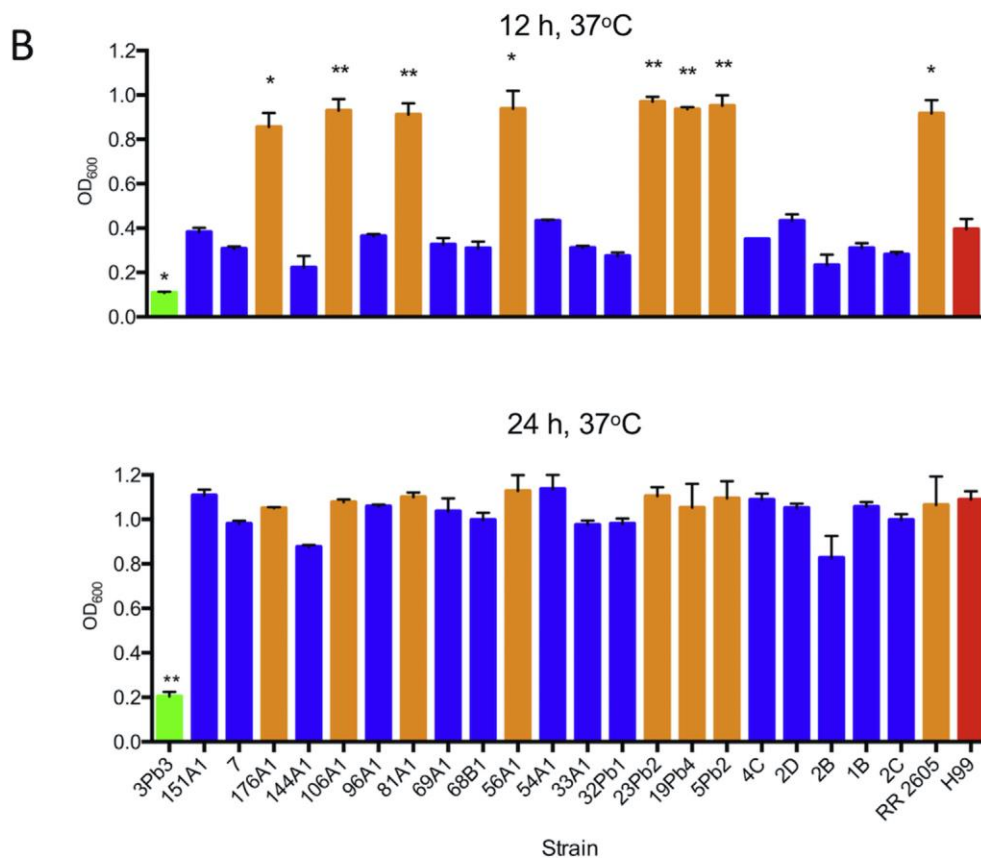
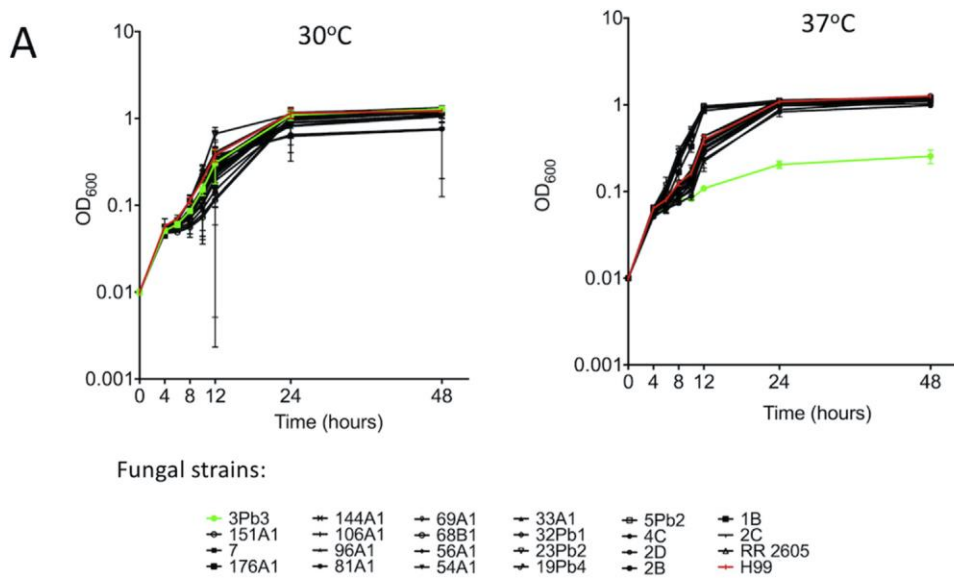
#### 4.3 Caracterização fenotípica de isolados de *C. neoformans*

A melanina é um importante fator de virulência no gênero *Cryptococcus* (18), o que nos levou a avaliar se os isolados identificados como *C. neoformans* VNI teriam diferenças de melanização. Os 23 isolados melanizaram similarmente em cultivo agar níger (Figura 7).



**Figura 7.** Imagem da tentativa de melanização dos 23 isolados de *C. neoformans* VNI e cepa controle H99 / ATCC 208821 em ágar níger. Nenhuma diferença visual foi observada entre as culturas de *C. neoformans*.

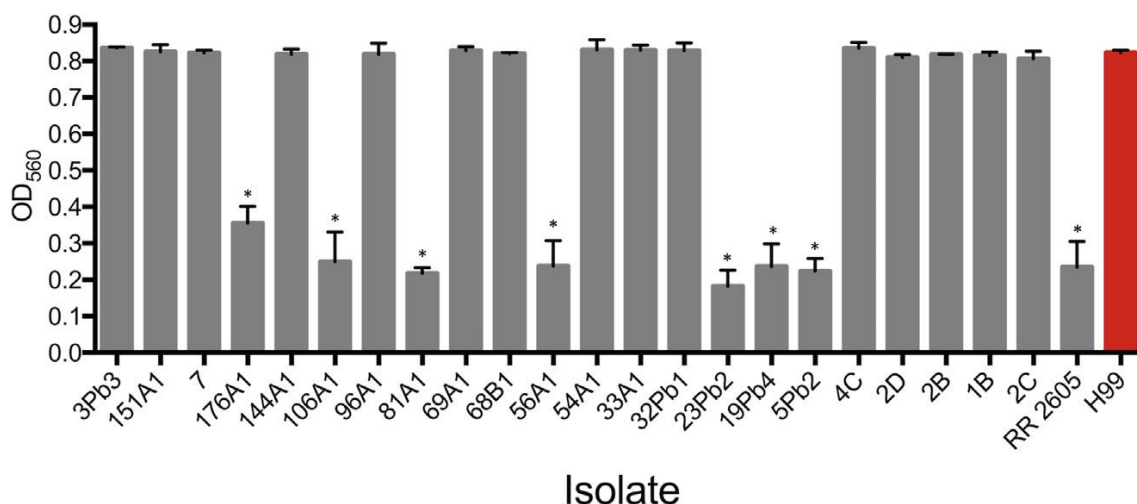
A capacidade de adaptação ao crescimento a diferentes temperaturas confere ao *Cryptococcus* uma importante característica de sobreviver no ambiente e também infectando o hospedeiro e por isso, avaliamos a capacidade de crescimento dos diferentes isolados a 30 e 37°C. A 30°C, nenhuma diferença significativa foi encontrada no crescimento dos diferentes isolados (Figura 8A). Já a 37°C, foi observado que oito isolados (176A1, 106A1, 81A1, 56A1, 23Pb2, 19Pb4, 5Pb2 e RR 2605) crescerem mais rapidamente nas primeiras 12 horas equiparada a cepa padrão H99 / ATCC 208821, mas nenhuma diferença significativa entre todos os isolados foi observada após 24 horas de cultivo, exceto para o isolado (3Pb3) que apresentou uma menor taxa de crescimento nos dois tempos avaliados (Figura 8A e B).





**Figura 8.** Taxas de crescimento dos 23 isolados de *C. neoformans* do estado de Roraima, Brasil, em comparação com a cepa padrão H99 / ATCC 208821. **(A).** Medição espectrofotométrica do crescimento de cada isolado testado a 30°C (painel da esquerda) e 37°C (painel da direita). A cepa padrão H99 / ATCC 208821 é destacada em vermelho. Todos os isolados tiveram taxas de crescimento semelhantes, com exceção do isolado 3Pb3, que manifestou menor capacidade de proliferar a 37°C (linha verde). **(B)** Análise estatística das taxas de proliferação em 12 e 24 horas após a inoculação em meio de cultura. Barras Laranjas denota crescimento fúngico alterado após 12 horas (\* P <0,05; \*\* P <0,0001) em comparação com a cepa padrão H99 / ATCC 208821 (barra vermelha). Barras azuis denotam crescimento fúngico a taxas semelhantes às descritas para a cepa padrão H99 / ATCC 208821. Após 24 horas, somente o isolado 3Pb3 (barra verde) apresentou taxas de proliferação estatisticamente diferentes daquelas calculadas para a cepa padrão H99 / ATCC 208821.

Devido ao papel bem conhecido da urease na patogênese de *Cryptococcus* (18), a atividade extracelular dessa enzima também foi determinada (figura 9). A maioria das cepas (15 isolados) manifestou níveis de atividade da urease semelhantes aos encontrados na cepa padrão H99 / ATCC 208821. No entanto, 8 isolados (56A1, 81A1, 106A1, 176A1, 5Pb2, 19Pb4, RR2605 e 23Pb2) produziram atividade enzimática muito menor.

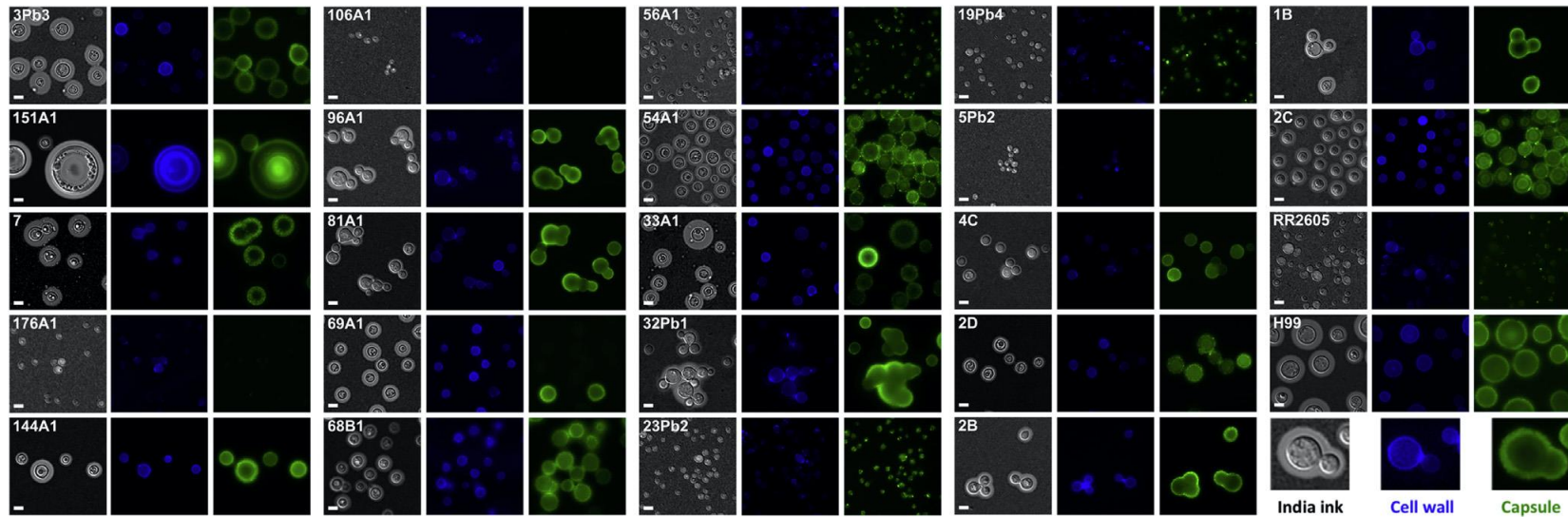


**Figura 9.** Determinação da atividade da urease em sobrenadantes de cultura dos isolados de *C. neoformans* de Roraima, em comparação com a cepa padrão H99 / ATCC 208821. Com exceção dos isolados 176A1, 106A1, 81A1, 56A1, 23Pb2, 19Pb4, 5Pb2 e RR2605, que produziram níveis significativamente menores de atividade de urease em comparação

com a cepa padrão H99 / ATCC 208821 (asteriscos,  $P < 0,0001$ ), todos os isolados produzidos níveis semelhantes de atividade de urease.

#### 4.4 Diversidade de polissacarídeos nos isolados de *C. neoformans*

Todos os isolados foram processados para exame microscópico por contra-coloração com tinta Nanquim e análise de superfície por microscopia de fluorescência (Figura 10). Apesar de todos os isolados de *C. neoformans* corresponderem ao tipo molecular VNI, uma grande variação morfológica foi observada após a contrastação com tinta Nanquim. Análises visuais do tamanho da cápsula revelaram isolados com dimensões muito pequenas (isolado 56A1, Figura 10), outros moderadamente reduzidas (isolado RR2605, Figura 10) e outros grandes (isolado 2D, Figura 10). Diferenças nos diâmetros das células também foram aparentes, como concluiu-se a partir da detecção de isolados com células muito pequenas (isolado 106A1, Figura 10), outros com células de levedura com as típicas dimensões criptocócicas (a maioria dos isolados, vide isolado 3Pb3 na Figura 10) e um isolado (151A1, Figura 10) com valores de diâmetro que eram compatíveis com aqueles descritos para as células Titãs. Diferenças no teor conteúdo de quitina na parede celular dos diferentes isolados também foram observados, como deduzido pela reatividade reduzida dos isolados 5Pb2, 19Pb4 e 176A1 com o calcofluor (Figura 10).



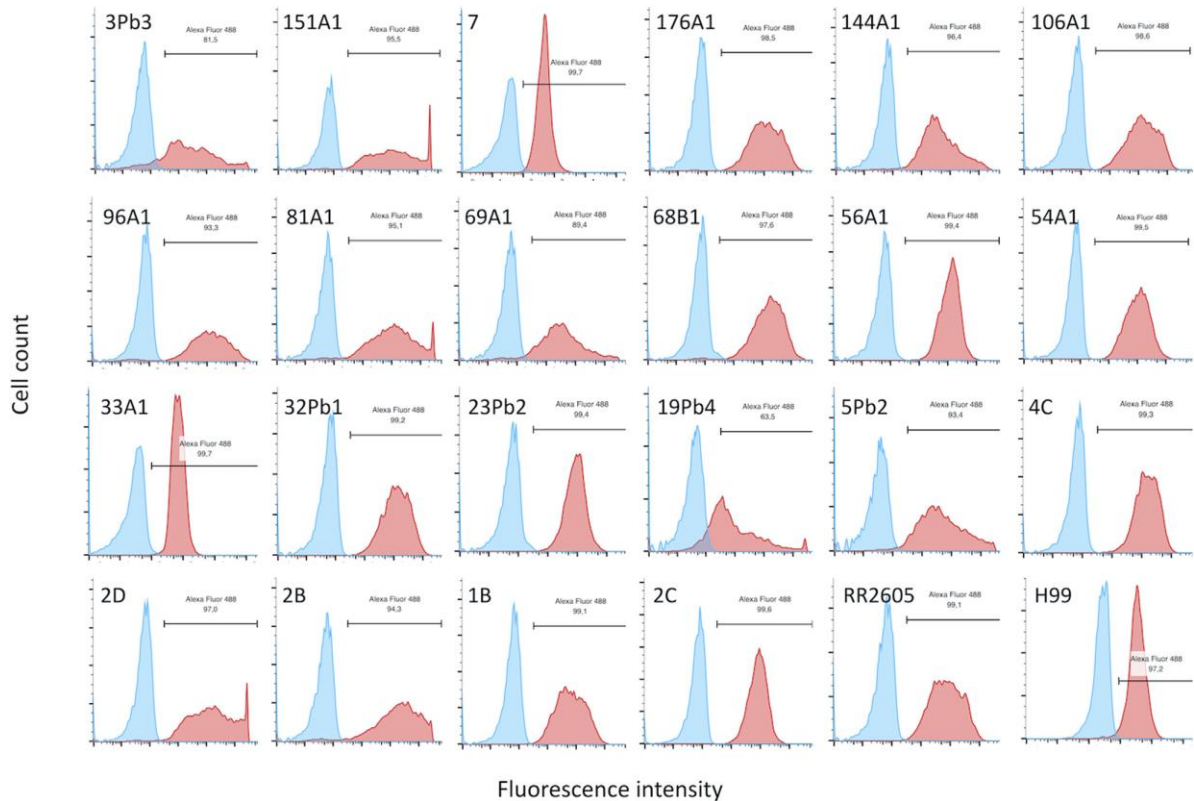
**Figura 10.** Exame microscópico dos isolados de *C. neoformans* de Roraima e da cepa padrão H99 / ATCC 208821. Para cada isolado, são mostrados contra-coloração com nanquim (painéis de campo escuro), ligação de calcofluor (fluorescência azul) e marcação de GXM (fluorescência verde). Ver a imagem ao fundo direito para ilustração dos compartimentos celulares analisados. Barras de escala, 5  $\mu$ m.

A reatividade capsular com o mAb anti-GXM 18B7 revelou pelo menos três perfis diferentes de ligação do anticorpo à capsula (Figura 10), que classificamos como anelares, agregados e pontilhados. Reações sorológicas praticamente negativas também foram observadas. A maioria dos isolados ( $n = 1$ ) demonstraram perfil agregado (3Pb3, 7, 144A1, 96A1, 69A1, 68B1, 54A1, 33A1, 2B, 2C e 2D), cinco demonstraram perfil anelar (151A1, 81A1, 32Pb1, 4C e 1B) e quatro apresentaram perfil pontilhado (56A1, 23Pb2, 19Pb4 e RR22605). Além disso, três isolados tiveram fluorescência praticamente indetectável (176A1, 106A1 e 5Pb2). Considerando que todos os isolados supostamente pertencem ao mesmo sorotipo, esses resultados reforçam as limitações da classificação de *Cryptococcus*.

A percepção visual de que as dimensões do corpo celular e da capsula eram variáveis foi confirmada por análises quantitativas (figura 11). Os diâmetros totais das células dos isolados (corpo celular + cápsula) variaram de 1 a 30  $\mu\text{m}$ , com valores médios mais concentrados na faixa de 7-8  $\mu\text{m}$  (figura 11A). O isolado que apresentou maior diâmetro foi o isolado 151A1, com o diâmetro variando de 2 a 30  $\mu\text{m}$ . Os isolados 23PB2, 19PB4, 5PB2 e RR2605, por outro lado, apresentaram os menores valores médios de diâmetro celular (aproximadamente 2  $\mu\text{m}$ ). As dimensões capsulares foram expressas como a razão entre a os diâmetros da cápsula e os diâmetros celulares (figura 11B). Cápsulas menores geraram valores próximos a 1 e cápsulas maiores produziram valores maiores. Os valores médios variaram de aproximadamente 1,4 a 2,2  $\mu\text{m}$ , com o isolado 2D manifestando a maior cápsula.

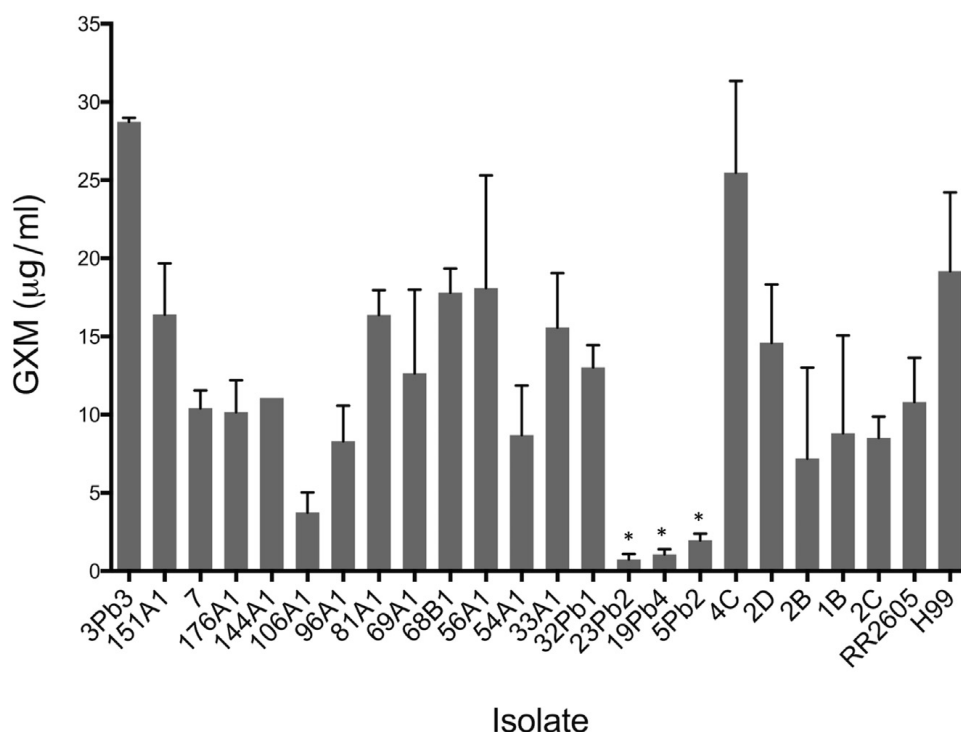


Nesta condição, a reatividade dos 23 isolados com o mAb 18B7 foi aumentada, conforme quantificado por citometria de fluxo (figura 12).



**Figura 12.** Determinação quantitativa da reatividade do mAb 18B7 com os isolados de *C. neoformans*. A análise de citometria de fluxo é mostrada para cada isolado. Histogramas azuis representam controles negativos (sem anticorpo primário). Os histogramas vermelhos representam a marcação das células fúngicas com o mAb 18B7.

Com base na importância da GXM extracelular tanto na fisiologia quanto na patogênese de *Cryptococcus*, analisamos a reatividade dos polissacarídeos extracelulares produzidos por cada isolado com mAb 18B7 e comparamos com a cepa padrão H99 / ATCC 208821 (figura 13). Uma grande diversidade na reatividade foi observada entre os isolados. As concentrações de GXM extracelular determinadas demonstraram variações de 1 a aproximadamente 30 µg/ml.

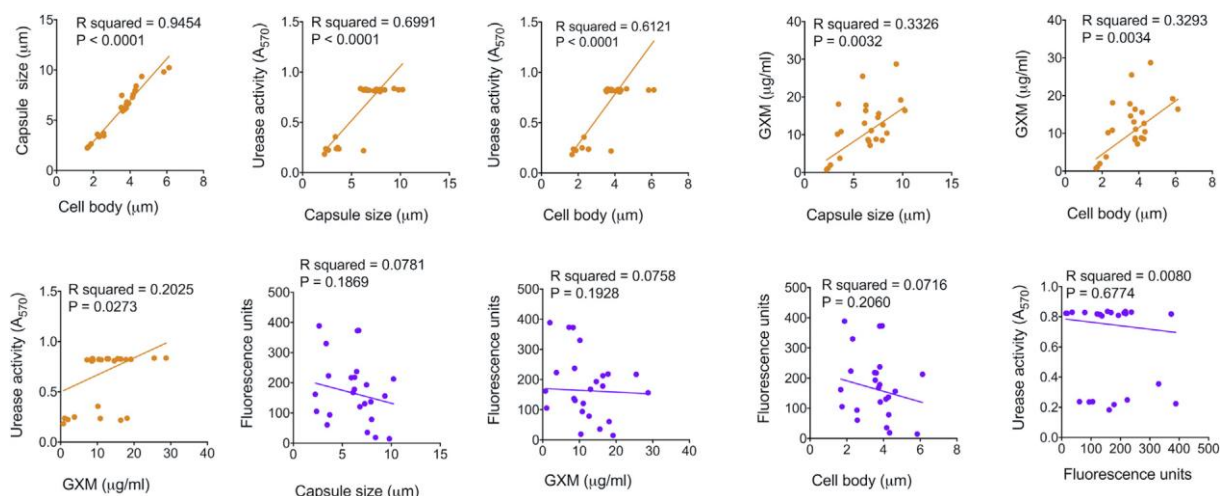


**Figura 13.** Detecção de GXM extracelular por ELISA. Cada sobrenadante foi analisado quanto à reatividade com o mAb 18B7, que demonstrou perfis de detecção de GXM baixo (isolados 106A1, 23Pb2, 19Pb4, 5Pb2), intermediário (isolados 151A1, 7, 176A1, 144A1, 96A1, 81A1, 69A1, 68B1, 56A1, 54A1, 33A1, 32Pb1, 2D, 2B, 1B, 2C e RR2605) e alto (3Pb3 e 4C) através de reatividade do polissacarídeo com o mAb 18B7. A análise estatística revelou diferenças significativas (\* $P < 0,05$ ) apenas quando a produção dos isolados 23Pb2, 19Pb4, 5Pb2 foi comparada com a produção dos isolados 3Pb3, 4C e a cepa padrão H99 / ATCC 208821).

4.5 Análise de correlação das dimensões celulares, tamanho da cápsula, detecção de GXM extracelular, reconhecimento sorológico da superfície celular e atividade da urease.

Após a coleta das informações sobre diversos parâmetros fenotípicos, foi realizada uma análise multifatorial das principais características observadas nos isolados de *C. neoformans* deste estudo. Analisamos a correlação matemática

entre tamanho da cápsula, diâmetros celulares, atividade da urease, detecção de GXM extracelular e reatividade sorológica do mAb 18B7 com a cápsula criptocócica (figura 14). Uma forte correlação entre o tamanho da cápsula e as dimensões do corpo celular foi observada ( $P < 0,0001$ ). As dimensões celulares também foram correlacionadas com a atividade da urease ( $P < 0,0001$ ) e a detecção da GXM extracelular ( $P = 0,0034$ ), mas não com a reatividade sorológica do mAb 18B7 com a cápsula ( $P = 0,4578$ ). Além de se correlacionar com as dimensões celulares, o tamanho da cápsula correlacionou-se com a atividade da urease ( $P < 0,0001$ ) e a detecção da GXM ( $P = 0,0032$ ), mas não com a ligação do mAb18B7 à cápsula ( $P = 0,6837$ ). A atividade da urease também foi correlacionada com a detecção de GXM extracelular ( $P = 0,0273$ ). Resultados negativos foram observados quando a ligação do anticorpo foi correlacionada com as dimensões capsulares ( $P = 0,4425$ ) e com a atividade da urease ( $P = 0,7258$ ).



**Figura 14.** Análises de correlação dos diferentes parâmetros avaliados no presente estudo. Os painéis de correlação começam com os valores de correlação mais altos, conforme inferidos pelo cálculo dos valores de R ao quadrado e da significância estatística



(valores de P). Linhas/pontos laranja denotam correlação positiva; linhas/pontos roxos indicam não haver correlação.

#### 4.6 Determinação da CIM para isolados ambientais

Os valores de CIM dos 23 isolados de Roraima, bem como os valores obtidos com a cepa padrão H99 / ATCC 208821, são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Concentração inibitória mínima (CIM) para anfotericina B e fluconazol dos 23 isolados de *C. neoformans* coletados nos municípios Pacaraima, Bonfim e Boa Vista, Roraima

| Identificação dos isolados |           | CIM ( µg/mL ) |      |
|----------------------------|-----------|---------------|------|
| Cepa                       | Origem    | FLZ           | AmB  |
| 1B                         | Bonfim    | 2.0           | 1.0  |
| 2B                         | Bonfim    | 2.0           | 1.0  |
| 2C                         | Bonfim    | 2.0           | 1.0  |
| 2D                         | Bonfim    | 4.0           | 2.0  |
| 4C                         | Bonfim    | 4.0           | 0.25 |
| 7                          | Pacaraima | 2.0           | 1.0  |
| 33A1                       | Boa Vista | 4.0           | 1.0  |
| 54A1                       | Boa Vista | 4.0           | 2.0  |
| 56A1                       | Boa Vista | 4.0           | 2.0  |
| 68B1                       | Boa Vista | 2.0           | 1.0  |
| 69A1                       | Boa Vista | 4.0           | 1.0  |
| 81A1                       | Boa Vista | 4.0           | 2.0  |
| 96A1                       | Boa Vista | 2.0           | 2.0  |
| 106A1                      | Boa Vista | 2.0           | 2.0  |
| 144A1                      | Boa Vista | 4.0           | 0.25 |
| 151A1                      | Boa Vista | 8.0           | 1.0  |
| 176A1                      | Boa Vista | 8.0           | 0.25 |
| 3Pb3                       | Boa Vista | 2.0           | 1.0  |
| 5Pb2                       | Boa Vista | 4.0           | 1.0  |
| 19Pb4                      | Boa Vista | 4.0           | 1.0  |
| 23Pb2                      | Boa Vista | 2.0           | 2.0  |
| 32Bp1                      | Boa Vista | 2.0           | 2.0  |
| RR 2605                    | Boa Vista | 4.0           | 0.25 |

continua...

|                                      |            |     |     |
|--------------------------------------|------------|-----|-----|
| H99 / ATCC 208821                    | Referência | 2.0 | 1.0 |
| <i>C. krusei</i> ATCC6258*           | Controle   | >64 | 0.5 |
| <i>C. parapsilosis</i><br>ATCC22019* | Controle   | 1.0 | 0.5 |

**Legenda:** Fluconazol (FLZ); AmB (AMB).

FLZ – Inibição de 50% do crescimento; AmB (AMB) – Inibição de 90% do crescimento. \* Cepas controle EUCAST: *C. krusei* ATCC6258 – MIC esperado AMB: 0.25-1 µg/mL; MIC esperado FLZ: 16->64 µg/mL. *C. parapsilosis* ATCC22019: CIM esperado AmB: 0.12-0.5 µg/mL; CIM esperado FLZ: 0.5-2 µg/mL.

Os valores de CIM para FLZ no conjunto das 24 amostras situaram-se entre 2.0 µg/mL a 8.0 µg/mL. Para AmB, os valores variaram de 0,25 µg/mL a 2.0 µg/mL.

Individualmente, quando comparados os valores de CIM para os 23 isolados ambientais com os valores encontrados para a cepa padrão H99 / ATCC 208821, foi possível verificar três faixas de valores de CIM para ambas as drogas. Para o FLZ obtivemos valores iguais aos obtidos para a cepa H99 / ATCC 208821 (2.0 µg/mL) nos isolados 1B, 2B, 2C, 7, 68B1, 96A1, 106A1, 3Pb3, 23Pb2 e 32Pb1. Para os isolados 2D, 4C, 33A1, 54A1, 56A1, 69A1, 81A1, 144A1, 5Pb2, 19Pb4 e RR 2605 o valor de CIM foi 4.0 µg/mL, e para os isolados 151A1 e 176A1, 8.0 µg/mL. O valor da CIM da AmB para a cepa padrão H99 / ATCC 208821 foi de 1.0 µg/mL. Para os isolados estudados, o valor de 0,25 µg/mL foi encontrado para os isolados 4C, 144A1, 176A1 e RR 2605, 1.0 µg/mL para os isolados 1B, 2B, 2C, 7, 33A1, 68B1, 69B1, 151A1, 3Pb3, 5Pb2 e 19Pb4, e 2.0 µg/mL para os isolados 2D, 54A1, 56A1, 81A1, 96A1, 106A1, 23Pb1 e 32Pb1.

## 5. DISCUSSÃO

Apesar de patogênico para humanos, *C. neoformans* e *C. gattii* são espécies de fungos ambientais. O habitat natural do *C. neoformans* inclui excretas de aves, especialmente de pombos domésticos (*C. livia*), embora o fungo já tenha sido isolado de fezes de outras aves, como *Melopsittacus undulatus* (periquito australiano), *Serinus canaria* (canário belga), *Taeniopigya guttata* (mandarim), *Agapornis* sp. (agapore) e *Nymphicus hollandicus* (calopsita) (204). A facilidade do desenvolvimento da levedura nesses ambientes se deve ao fato de que este fungo utiliza a creatina, o ácido úrico, as purinas e xantinas presentes nas excretas como fonte de nitrogênio para sua sobrevivência e reprodução (205).

Dados de publicações nacionais relacionados a *C. neoformans*, descrevem sua presença em todas as regiões brasileiras. De acordo com os dados epidemiológicos relacionados à criptococose para o Brasil, a macrorregião norte (Amazonas, Roraima, Pernambuco, Piauí e Bahia) é classificada como endêmica para *C. gattii*, enquanto a macrorregião sul (Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul), em que há predomínio da infecção por *C. neoformans* (206), endêmica para essa espécie. Wirth *et al.* (207) demonstraram que várias regiões exibiram alta prevalência do tipo molecular VNI e casos esporádicos dos tipos moleculares VNII e VGII no Brasil. A predominância do tipo molecular do VNI foi descrita nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso, Amazonas, Piauí, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro. Nunes *et al.* (208) caracterizaram tipos moleculares do complexo de espécies *Cryptococcus*

isolados de pacientes com meningite criptocócica no estado do Mato Grosso do Sul. Esses resultados revelaram 105 (87,5%) e 5 (55,6%) isolados dos complexos *C. neoformans* e *C. gattii*, respectivamente. Destes, a maioria dos isolados eram pertencentes ao tipo molecular VNI (89,1%), enquanto os tipos moleculares VGII (7%) e VNII (3,9%) foram observados com menor frequência.

Em relação aos isolados ambientais, os achados aqui apresentados estão de acordo com os dados da literatura que mostram forte associação entre *C. neoformans* em excretas de pombos (204,209), onde confirmamos a prevalência desses isolados no Norte do Brasil (199). Pelo método MALDI-TOF foi possível classificar os 23 isolados, com ID de 99,9% de acurácia, como pertencentes ao genótipo VNI. Outros estudos usaram a mesma abordagem, com acurácia próxima a 100% para diferenciação dos diferentes genótipos do complexo de espécies de *Cryptococcus* (237,238). Em nosso estudo, foi possível isolar de excretas de pombos, *C. neoformans* pertencente ao genótipo VNI (8% em um total de 212 amostras), provenientes da capital do estado de Roraima, Boa Vista (n=11 isolados), além dos municípios Pacaraima (n=1 isolado) e Bonfim (n=5 isolados) que fazem fronteira com os países da Venezuela e Guiana, respectivamente. Valores superiores de positividade para *C. neoformans* VNI em comparação aos nossos achados foram descritos na literatura (210–213), Reolon *et. al.* (214) obtiveram 88 (100%) das amostras avaliadas como pertencentes ao genótipo VNI, confirmando a prevalência deste genótipo em isolados provenientes de excretas de pombos que habitavam nas praças da capital Porto Alegre. Outro estudo realizado na cidade de Tripoli na Níbia, Ellabib *et. al.* (215), coletaram 100 amostras de

excretas pombos, destas, 34% foram positivas para *C. neoformans* VNI. Porém, o valor de 8% de positividade para *C. neoformans* VNI em nosso estudo, se aproximou dos dados descritos por Cafarchia *et al.* (209), que obtiveram 9,9% de positividade de *C. neoformans* VNI em amostras de swabs de cloaca em diferentes espécies de aves. Valores de 5,7% positivos para *Cryptococcus* spp. foram também isolados a partir de excretas de pombos, descritos por Ribeiro F. (216), no município de Maringá/PR.

Uma hipótese possível sobre a baixa taxa de isolamento de *C. neoformans* em nossos estudos, se deve à baixa quantidade de excremento de pombo disponível e às altas temperaturas comuns em todo ano no estado de Roraima. O gênero *Cryptococcus* não cresce usualmente em temperaturas acima de 40° C e os excrementos também estão sujeitos à lixiviação e à exposição à luz solar direta, o que pode esterilizar os locais contaminados por esta levedura (217).

Nos três municípios estudados, a quantidade de coleta das amostras de excretas variou de acordo com a quantidade e ninho das aves presentes nesses locais. Os valores de UFC/g de excretas variou de 100 a 12.700 UFC/g. Nossos resultados foram similares aos valores achados por Contin *et al.* (192), que obtiveram valores de até 20.000 UFC/g a partir de amostras de excreta de aves. Valores inferiores de UFC/g, quando comparado com algumas amostras obtidas em nosso estudo, foram descritos por Filiú *et al.* (204), chegando ao isolamento de 900 UFC/g de *C. neoformans* em excretas de aves em cativeiros. Nos três municípios analisados, os resultados obtidos foram relevantes com a presença de *C. neoformans*, principalmente devido à exposição de pacientes

imunocomprometidos, que consistem em um importante grupo de risco para desenvolver a criptococose (58).

Espécies de fungos que causam doenças em humanos e animais são principalmente representado por microrganismos ambientais que desenvolveram mecanismos para causar danos aos hospedeiros mamíferos (218). Nesse contexto, agora está claro que o arsenal de virulência usado pelas células fúngicas durante a doença, incluindo a cápsula criptocócica, é impactado pelo ambiente (219). Alguns autores buscaram relacionar o tamanho da cápsula em cultura com a virulência de *C. neoformans*. No entanto, observou-se que em condições de cultivo tradicional, a levedura apresenta tamanho de cápsula reduzido (197). Rivera *et al.* (220) relata que no decorrer da infecção o tamanho da cápsula pode variar dependendo do órgão infectado, sendo o pulmão o órgão de maior tamanho capsular identificado. O potencial para a diversidade patogênica em cepas ambientais e o seu consequente impacto em doenças humanas ainda é imprevisível. Em nosso estudo, analisamos as características fenotípicas de isolados ambientais de *C. neoformans* obtidos de uma região endêmica do Brasil. Nestes isolados, observamos uma diversidade considerável em vários parâmetros. No entanto, as diferenças mais marcantes foram relacionadas à urease, um importante fator de virulência necessário para a invasão do sistema nervoso central, e componentes da cápsula polisacarídica, importante para a persistência de *C. neoformans* no hospedeiro mamífero (195).

Outra enzima que contribui com a virulência de *Cryptococcus* é a enzima lacase. Ela é responsável pela conversão de substratos difenólicos a melanina, na

presença de oxigênio. A síntese de melanina está relacionada com neurotropismo em *C. neoformans* (110). Estudos anteriores demonstraram que uma maior atividade de lacase em *C. neoformans* aumenta sua sobrevivência dentro de macrófagos (221). As melaninas são pigmentos de alto peso molecular negativamente carregadas, hidrofóbica, anamorfa e insolúvel em solventes aquosos e orgânicos, sendo responsável pela proteção do fungo contra os danos dos raios UV no ambiente, promovendo termotolerância (222), além de um fator de virulência associado também à resistência a peptídeos anti-microbianos produzidos pelo hospedeiro (104). Observamos em nosso estudo que todos os isolados demonstraram capacidade similar de produzir a melanina em meio agar níger após 72 horas de incubação a 37°C. A melanina está relacionada com a redução a suscetibilidade a determinados antifúngicos como AmB e caspofungina (110,223).

A análise das características relacionadas com a patogênese em cada isolado revelou uma alta complexidade. Por exemplo, é bem conhecido que a formação de cápsula, a liberação de GXM e a produção de urease são essenciais para a virulência criptocócica (18). Vários isolados foram eficientes em produzir todos os três determinantes de virulência. Outros isolados, por outro lado, produziram painéis fenotípicos mais complexos. O isolado 3Pb3, por exemplo, foi o maior produtor de GXM extracelular. Este isolado também foi eficiente na formação de uma cápsula e produziu altos níveis de urease, mas apresentou crescimento defeituoso a 37°C. Os isolados 23Pb2, 19Pb4 e 5Pb2 cresceram bem a 37°C, mas foram baixos produtores de cápsula, urease e GXM extracelular. O isolado (4C) foi produtor eficiente de todos os fatores analisados em nosso estudo. Neste contexto,

parece improvável que os isolados fúngicos com crescimento defeituoso a 37°C tenham um potencial patogênico relevante, mesmo sob condições de alta produção de urease e GXM. Da mesma forma, cepas de crescimento rápido provavelmente não causariam danos ao hospedeiro sob condições de expressão reduzida de fatores de virulência. Em resumo, esses resultados sugerem que o potencial patogênico dos isolados ambientais de Roraima é difícil de prever, mas altamente diversificado.

Todos os isolados utilizados em nosso estudo são da espécie *C. neoformans*, pertencentes ao genótipo VNI que correspondem à variedade *grubii* de acordo com a classificação tradicionalmente usada para o complexo de espécies *C. neoformans/C. gattii* (16). *C. neoformans* var. *grubii* produz polissacarídeos capsulares do sorotipo A (224). A sorotipagem de polissacarídeos é baseada na relação entre o reconhecimento sorológico e as particularidades estruturais (18) o que implica que os isolados de VNI deveriam produzir padrões semelhantes de reconhecimento de anticorpos. Nossos resultados atuais contradizem fortemente esta suposição, como concluído a partir dos padrões variáveis de reconhecimento sorológico dos isolados pelo mAb 18B7. Esta observação provavelmente impacta a interpretação no nosso modelo de detecção de GXM em sobrenadantes de cultura. A reatividade de GXM extracelular com o mAb 18B7 foi altamente variável, o que poderia certamente ser resultante de capacidades diferenciais de cada isolado para produzir e exportar GXM. Resultados similares foram descritos por Cleare *et al.* (225) e Garcia-Hermoso *et al.* (226) utilizando o mAb 2H1, mencionaram que isolados de *C. neoformans*



poderiam ter padrões heterogêneos, ou seja, o perfil molecular estabelece o fenótipo individual de cada célula, porém reproduzíveis quando analisados por citometria de fluxo (227). Estas mudanças na dinâmica capsular resultariam em uma população muito heterogênea de células criptocócicas que diferem em sua composição antigênica. Esse fator prejudicaria a eficácia da resposta imune. Sabe-se que densidade das fibras polissacarídicas aumentam *in vitro* (228) e também *in vivo* durante a infecção (229). Embora as consequências desse aumento na densidade não sejam totalmente conhecidas, supõe-se que seja afetada a funcionalidade de elementos da resposta imune, como anticorpos e o sistema complemento, ou ainda peptídeos antimicrobianos (230).

A nossa análise por imunofluorescência revelou que os isolados de *C. neoformans* apresentaram diferentes perfis de reatividade com anticorpo. Observou-se ainda que os isolados analisados neste estudo tiveram eficiência baixa, média e alta na produção de GXM. No entanto, a possibilidade de diferentes estruturas de GXM serem produzidas em cada isolado não pode ser descartada. Esses resultados ilustraram com eficiência as limitações da classificação clássica baseada no sorotipo.

Nosso estudo revelou uma interessante e ainda pouco compreendida correlação entre diferentes características fenotípicas em *C. neoformans*. Algumas das correlações positivas foram de fato esperadas (tamanho da cápsula ou dimensões celulares com detecção de GXM extracelular). De fato, a correlação mais forte observada em nosso estudo resultou da análise das dimensões capsulares e celulares. No entanto, também observamos valores de correlação

intrigantes envolvendo a atividade da urease, que se correlacionou com dimensões celulares, tamanho da cápsula e detecção da GXM extracelular.

A atividade secretora é obrigatória para a funcionalidade de todos os quatro parâmetros (231), o que sugere uma conexão entre o potencial de secreção de cada isolado com a capacidade de produzir mecanismos de virulência. Por outro lado, sorologia e o reconhecimento da cápsula não se correlacionaram com o tamanho da cápsula e detecção extracelular de GXM. O reconhecimento da cápsula pelo mAb 18B7, de fato, não se correlacionou com nenhum dos parâmetros analisados em nosso estudo, confirmando o que foi discutido anteriormente de que propriedades sorológicas consistem em um sistema frágil de classificação do gênero *Cryptococcus*. A importância dos achados aqui descritos para o potencial patogênico de *C. neoformans* ainda precisa ser explorada, mas a alta diversidade observada em nosso estudo é compatível com a observação de que características fenotípicas podem se correlacionar com a manifestação da doença.

A necessidade de testes padronizados e reprodutíveis de suscetibilidade antifúngica (AST) foi motivada pelo crescente número de infecções fúngicas e pelo reconhecimento da resistência antifúngica como um problema clínico importante (148,232,233). Os testes de suscetibilidade antifúngica *in vitro* são padronizados internacionalmente, o que é essencial no gerenciamento e vigilância de resistência (234,235).

A avaliação da suscetibilidade aos antifúngicos neste estudo revelou também uma variabilidade. Os isolados apresentaram variabilidade de

susceptibilidade para fluconazol, com CIMs variando de 2.0 a 8.0 µg/mL. Para AmB, os valores situaram-se entre 0,25 µg/mL a 2.0 µg/mL. Portanto, todos os isolados foram sensíveis e não apresentaram perfil de resistência aos antifúngicos testados. Valores distintos foram demonstrados no estado do Amazonas por Alves *et al.* (61), onde a avaliação da susceptibilidade aos antifúngicos utilizando a metodologia do E-test®, revelou valores diferentes para os isolados de *C. neoformans* presentes em poeira domiciliar, com elevada variabilidade de susceptibilidade para fluconazol (CIMs variando de 2.0 a 48 µg/mL). Soares *et al.*, (2005) estudaram a sensibilidade a antifúngicos de 11 amostras de *C. neoformans* isoladas de excretas de *Columba livia* segundo a metodologia EUCAST. Todas as cepas foram sensíveis a AmB, com valores 0,25 a 1 µg/mL. Para o fluconazol, 9% dos isolados foram classificados como resistentes (CIM = 64 µg/mL), sendo o restante dos isolatos inibidos por concentrações iguais ou menores que 8 µg/mL. Na cidade de Goiânia-GO, Sousa *et al.* (236) utilizaram o método de microdiluição em caldo (referência NCCLS M27-A2) e obtiveram valores de CIM para isolados clínicos de *C. neoformans* de 0,06-1,0 µg/mL para AmB, 0,125-8 µg/mL para fluconazol, 0,03-0,5 µg/mL para itraconazol e 0,03-0,25 µg/mL para voriconazol. Os isolados ambientais de *C. neoformans* apresentaram valores de CIM 0,015-0,125 µg/mL, 0,25-2,0 µg/mL, 0,007-0,125 µg/mL e 0,03-0,25 µg/mL para AmB, fluconazol, itraconazol e voriconazol, respectivamente.

Os mecanismos mais comuns de resistência a azóis estão bem descritos para *Saccharomyces cerevisiae* e espécies patogênicas de *Candida*, como *C. albicans* e *C. glabrata*. Estas espécies são filogeneticamente distantes de *C.*

*neoformans*, mas sabe-se que nelas ocorrem vários mecanismos que podem estar envolvidos com resistência. Esses fatores incluem menor acúmulo intracelular de antifúngicos azólicos associado com maior expressão de proteínas de efluxo celular *Afr1* e *Mdr1*, além de superprodução de alvos de azóis, e implementação de vias metabólicas alternativas e/ou alterações na molécula 14- $\alpha$ -demetilase (237). No gênero *Cryptococcus* spp., modificações na membrana celular decorrentes de alterações na biossíntese do ergosterol representam um dos mecanismos associados ao fluconazol (237).

A resistência natural de *Cryptococcus* spp. à AmB não foi relatada na literatura, mas a resistência adquirida, apesar de rara foi descrita (238,239). As cepas resistentes apresentaram, de modo geral, alterações na composição dos esteróis das membranas, com diminuição ou ausência do ergosterol e substituição por outros esteróis, gerando menor eficiência da ligação da AmB (239,240). Além disso, a relação entre mutações genéticas em *Cryptococcus* spp. e valores de CIM elevados para este antifúngico ainda não foi totalmente esclarecida (241).

Atualmente, no estado de Roraima, não há dados publicados sobre a susceptibilidade a antifúngicos em isolados obtidos a partir de excretas de pombos, no entanto, a suscetibilidade dos isolados à AmB é alta nesta região norte (54,159,242).

A determinação do genótipo das espécies de *Cryptococcus* é muito importante para o entendimento da epidemiologia desse grupo de microrganismos. Diferenças de suscetibilidade frente aos antifúngicos entre os diferentes genótipos já foi descrita, enfatizando a importância de definir o tipo molecular ao se

diagnosticar a criptococose, para assim decidir qual a melhor opção de tratamento (243).

Cabe reforçar que *C. neoformans* é classificado como patógeno oportunista adquirido no meio ambiente, através da inalação de partículas infectantes. No meio ambiente, esses agentes estão expostos aos mais diversos estímulos físicos, químicos e ameaças predatórias que induzem alterações adaptativas no genoma para sua sobrevivência. Em nichos naturais essas espécies demonstram facilidade de se adaptarem a distintas situações decorrentes da interação com agentes predatórios, de modo a garantir sua preservação e multiplicação. A extensão e mecanismos dessa plasticidade merecem ser mais profundamente investigados, com vistas a detectar pontos críticos que podem ser alvos de controle para manejo da criptococose (8,244).

O estado de Roraima possui um perfil epidemiológico único de criptococose devido ao seu status socioeconômico, incluindo desigualdade social e econômica, condições sanitárias e baixo acesso a serviços de saúde, além de um fluxo migratório recente sem precedentes. A diferenciação de espécies de *Cryptococcus* patogênicas fornece dados úteis para estudos e diagnóstico clínico e tratamento de pacientes.

O trabalho aqui apresentado mostra parâmetros epidemiológicos de *Cryptococcus* nunca demonstrados, abrindo precedentes para novos estudos e diretrizes que buscam entender melhor a dinâmica da criptococose no estado de Roraima.

## 6. PERSPECTIVAS

- A criptococose é uma doença potencialmente fatal em todo o mundo. Ela está distribuída por todos os estados do Brasil, assumindo um papel relevante dentre as infecções fúngicas oportunistas. Os objetos de estudo dessa tese podem abrir uma interessante perspectiva sobre a epidemiologia e os fatores de virulência do *C. neoformans*. A ocorrência de meningite criptocócica causada por *C. neoformans* tem sido registrada na região Norte, notadamente acometendo pacientes de ambos os sexos com índices importantes de morbidade e mortalidade em áreas endêmicas na região. Dessa forma, pode-se especular sobre a importância de estudos futuros, incluindo a determinação da diversidade genética de *Cryptococcus* pela técnica de tipagem molecular por sequenciamento de multilocus (MLST), estudos comparativos da frequência de ocorrência *C. neoformans* no período do inverno, nos mesmos biótopos pertencentes aos municípios de Pacaraima, Bonfim e Boa Vista – RR e, finalmente, validar os dados aqui obtidos com o potencial de virulência dos isolados em modelo de criptococose animal. É também importante discutir a possibilidade de elaborar material informativo para divulgar junto à população de áreas afetadas pelo *C. neoformans*, visando auxiliar na prevenção desta micose.

## 7. CONCLUSÕES

- *C. neoformans* encontra-se presente em amostras ambientais, provenientes de excretas de pombos em diferentes locais particulares e públicos das cidades de Pacaraima, Bonfim e na capital Boa Vista, no estado de Roraima. Os isolados de *C. neoformans* pertenceram ao genótipo VNI.
- Todos os isolados de *C. neoformans* formaram melanina e demonstraram capacidade de multiplicação a 30°C e 37°C, com exceção do isolado 3Pb3, que apresentou deficiência de crescimento a 37°C. Apenas 34% (n=8 isolados) demonstraram taxas de crescimento elevadas nas primeiras 12 horas, não apresentando diferenças no crescimento após 24 horas de incubação.
- Os fatores de virulência avaliados, como secreção de GXM, tamanho cápsula e urease, apresentaram diferenças expressivas entre os isolados. Esses dados sugerem que os isolados avaliados neste estudo apresentam potencial de virulência altamente diversificado.
- Embora ainda não haja pontos de corte estabelecidos para determinação de resistência aos antifúngicos de *Cryptococcus* spp, foi possível observar que os isolados de *C. neoformans* apresentaram sensibilidade para ao fluconazol e anfotericina B.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Quindós G. Epidemiología de las micosis invasoras: un paisaje en continuo cambio. *Rev Iberoam Micol.* 1º de outubro de 2018;35(4):171–8.
2. Benedict K, Richardson M, Vallabhaneni S, Jackson BR, Chiller T. Emerging issues, challenges, and changing epidemiology of fungal disease outbreaks. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(12):e403–11.
3. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. *J Fungi.* dezembro de 2017;3(4):57.
4. Rodrigues ML. Neglected disease, neglected populations: the fight against *Cryptococcus* and cryptococcosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 12 de abril de 2018 [citado 31 de agosto de 2019];113(7). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5909085/>
5. Brown GD, Denning DW, Levitz SM. Tackling Human Fungal Infections. *Science.* 11 de maio de 2012;336(6082):647–647.
6. Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, Jarvis JN, Govender NP, Chiller TM, et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(8):873–81.
7. Facilitators of adaptation and antifungal resistance mechanisms in clinically relevant fungi | Elsevier Enhanced Reader [Internet]. [citado 2 de setembro de 2019]. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1087184519301975?token=DC0C41DD6C157E8C76A0D4C2F1F0845F419DB3200920537C070B9B3E0A06B51224129954D869C7909B6A140FD2642B84>
8. de S Araújo GR, Souza W de, Frases S. The hidden pathogenic potential of environmental fungi. *Future Microbiol.* 2017;12:1533–40.
9. Cox GM, Harrison TS, McDade HC, Taborda CP, Heinrich G, Casadevall A, et al. Superoxide Dismutase Influences the Virulence of *Cryptococcus neoformans* by Affecting Growth within Macrophages. *Infect Immun.* 1º de janeiro de 2003;71(1):173–80.
10. Cox GM, McDade HC, Chen SCA, Tucker SC, Gottfredsson M, Wright LC, et al. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol.* 2001;39(1):166–75.
11. Rutherford JC. The Emerging Role of Urease as a General Microbial Virulence Factor. *PLOS Pathog.* 15 de maio de 2014;10(5):e1004062.



12. Janbon G, Quintin J, Lanternier F, d'Enfert C. Studying fungal pathogens of humans and fungal infections: fungal diversity and diversity of approaches. *Genes Immun.* 2019;20(5):403–14.
13. May RC, Stone NRH, Wiesner DL, Bicanic T, Nielsen K. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(2):106–17.
14. Vechi HT, Theodoro RC, de Oliveira AL, Gomes RMO da S, Soares RD de A, Freire MG, et al. Invasive fungal infection by *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* with bone marrow and meningeal involvement in a HIV-infected patient: a case report. *BMC Infect Dis.* 4 de março de 2019;19(1):220.
15. Findley K, Rodriguez-Carres M, Metin B, Kroiss J, Fonseca Á, Vilgalys R, et al. Phylogeny and Phenotypic Characterization of Pathogenic *Cryptococcus* Species and Closely Related Saprobiotic Taxa in the Tremellales. *Eukaryot Cell.* 1º de março de 2009;8(3):353–61.
16. Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Kolecka A, Polacheck I, Sionov E, et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol.* 1º de maio de 2015;78:16–48.
17. Lin X, Heitman J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. *Annu Rev Microbiol.* 2006;60(1):69–105.
18. Kwon-Chung KJ, Fraser JA, Doering TL, Wang Z, Janbon G, Idnurm A, et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. julho de 2014 [citado 9 de setembro de 2019];4(7). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4066639/>
19. Ellis D, Pfeiffer T. The ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Eur J Epidemiol.* 1º de maio de 1992;8(3):321–5.
20. Skalski JH, Limper AH. Fungal, Viral, and Parasitic Pneumonias Associated with Human Immunodeficiency Virus. *Semin Respir Crit Care Med.* abril de 2016;37(2):257–66.
21. Chang YC, Stins MF, McCaffery MJ, Miller GF, Pare DR, Dam T, et al. Cryptococcal Yeast Cells Invade the Central Nervous System via Transcellular Penetration of the Blood-Brain Barrier. *Infect Immun.* 1º de setembro de 2004;72(9):4985–95.
22. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS.* fevereiro de 2009;23(4):525.
23. Yoon HA, Felsen U, Wang T, Pirofski L-A. *Cryptococcus neoformans* infection in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-infected and HIV-uninfected patients at an inner-city tertiary care hospital in the Bronx. *Med Mycol.* 25 de julho de 2019;
24. Khawcharoenporn T, Apisarnthanarak A, Mundy LM. Non-*neoformans* cryptococcal infections: a systematic review. *Infection.* abril de 2007;35(2):51–8.

25. Feldmesser M, Kress Y, Casadevall A. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. *Microbiology*,. 2001;147(8):2355–65.
26. Kozubowski L, Heitman J. Profiling a killer, the development of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Microbiol Rev*. 1º de janeiro de 2012;36(1):78–94.
27. Zaragoza O, Nielsen K. Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: cells with a giant impact. *Curr Opin Microbiol*. 1º de agosto de 2013;16(4):409–13.
28. Mukaremera L, Lee KK, Wagener J, Wiesner DL, Gow NAR, Nielsen K. Titan cell production in *Cryptococcus neoformans* reshapes the cell wall and capsule composition during infection. *Cell Surf*. 1º de março de 2018;1:15–24.
29. Okagaki LH, Strain AK, Nielsen JN, Charlier C, Baltes NJ, Chrétien F, et al. Cryptococcal Cell Morphology Affects Host Cell Interactions and Pathogenicity. *PLOS Pathog*. 17 de junho de 2010;6(6):e1000953.
30. Gerstein AC, Fu MS, Mukaremera L, Li Z, Ormerod KL, Fraser JA, et al. Polyploid Titan Cells Produce Haploid and Aneuploid Progeny To Promote Stress Adaptation. *mBio*. 30 de outubro de 2015;6(5):e01340-15.
31. Poley M, Koubek R, Walsh L, McGillen B. Cryptococcal Meningitis in an Apparent Immunocompetent Patient. *J Investig Med High Impact Case Rep*. dezembro de 2019;7:2324709619834578.
32. Hurtado JC, Castillo P, Fernandes F, Navarro M, Lovane L, Casas I, et al. Mortality due to *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in low-income settings: an autopsy study. *Sci Rep*. 16 de maio de 2019;9(1):1–10.
33. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*. fevereiro de 2009;23(4):525.
34. Brown GD, Denning DW, Gow NAR, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Sci Transl Med*. 19 de dezembro de 2012;4(165):165rv13-165rv13.
35. Consenso em criptococose: 2008. *Rev Soc Bras Med Trop*. outubro de 2008;41(5):524–44.
36. Vidal JE, Gerhardt J, Peixoto de Miranda ÉJ, Dauar RF, Oliveira Filho GS, Penalva de Oliveira AC, et al. Role of quantitative CSF microscopy to predict culture status and outcome in HIV-associated cryptococcal meningitis in a Brazilian cohort. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1º de maio de 2012;73(1):68–73.
37. Kwon-Chung K.J.; Boekhout T.; Fell J.W.; Diaz M. 2002. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon*. 51(4):804-806 [Internet]. [citado 16 de setembro de 2019]. Disponível em:

<http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?TableKey=14682616000000061&Rec=23667&Fields=All>

38. Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: Separate Varietal Status for *Cryptococcus neoformans* Serotype A Isolates. *J Clin Microbiol.* 1º de março de 1999;37(3):838–40.
39. Kwon-Chung KJ. 82 - *Filobasidiella* Kwon-Chung. In: Kurtzman CP, Fell JW, organizadores. *The Yeasts (Fourth Edition)* [Internet]. Amsterdam: Elsevier; 1998 [citado 16 de outubro de 2019]. p. 656–62. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444813121500873>
40. Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Wickes BL, Meyer W, Cuomo CA, Wollenburg KR, et al. The Case for Adopting the “Species Complex” Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *mSphere.* 22 de fevereiro de 2017;2(1):e00357-16.
41. Bennett JE, Kwon-Chung KJ, Howard DH. EPIDEMIOLOGIC DIFFERENCES AMONG SEROTYPES OF *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*. *Am J Epidemiol.* 1º de junho de 1977;105(6):582–6.
42. Prakash A, Randhawa HS, Khan ZU, Ahmad S, Hagen F, Meis JF, et al. Environmental distribution of *Cryptococcus* species and some other yeast-like fungi in India. *Mycoses.* 2018;61(5):305–13.
43. Lengeler KB, Cox GM, Heitman J. Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating-type locus. *Infect Immun.* janeiro de 2001;69(1):115–22.
44. Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7 de dezembro de 2004;101(49):17258–63.
45. Nishikawa MM, Lazera MS, Barbosa GG, Trilles L, Balassiano BR, Macedo RCL, et al. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. *J Clin Microbiol.* janeiro de 2003;41(1):73–7.
46. Zentralblatt fuer bakteriologie [Internet]. 1894 [citado 25 de outubro de 2019]. 1087 p. Disponível em: [http://archive.org/details/bub\\_gb\\_cRAuAAAAIAAJ](http://archive.org/details/bub_gb_cRAuAAAAIAAJ)
47. Emmons CW. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in pigeon habitats. *Public Health Rep.* abril de 1960;75(4):362–4.
48. Hsu MM, Chang JC, Yokoyama K, Nishimura K, Miyaji M. Serotypes and mating types of clinical strains of *Cryptococcus neoformans* isolated in Taiwan. *Mycopathologia.* fevereiro de 1994;125(2):77–81.

49. Frey D, Durie EB. THE ISOLATION OF CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS (TORULA HISTOLYTICA) FROM SOIL IN NEW GUINEA AND PIGEON DROPPINGS IN SYDNEY, NEW SOUTH WALES. *Med J Aust.* 20 de junho de 1964;1:947–9.
50. Mishra SK, Ajello L, Ahearn DG, Burge HA, Kurup VP, Pierson DL, et al. Environmental mycology and its importance to public health. *J Med Vet Mycol Bi-Mon Publ Int Soc Hum Anim Mycol.* 1992;30 Suppl 1:287–305.
51. Kozel TR, Hermerath CA. Binding of cryptococcal polysaccharide to *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 1º de março de 1984;43(3):879–86.
52. Lazera MS, Wanke B, Nishikawa MM. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Vet Mycol.* 1º de janeiro de 1993;31(6):449–54.
53. Granados DP, Castañeda E. Isolation and Characterization of *Cryptococcus neoformans* Varieties Recovered from Natural Sources in Bogotá, Colombia, and Study of Ecological Conditions in the Area. *Microb Ecol.* 1º de fevereiro de 2005;49(2):282–90.
54. Firacative C, Lizarazo J, Illnait-Zaragozí MT, Castañeda E, Firacative C, Lizarazo J, et al. The status of cryptococcosis in Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2018 [citado 28 de outubro de 2019];113(7). Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0074-02762018000700203&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0074-02762018000700203&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
55. Machado CC, Amaral AA, Severo LC. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* isolado do solo. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* fevereiro de 1993;35(1):77–9.
56. Takahara DT, Lazéra M dos S, Wanke B, Trilles L, Dutra V, Paula DAJ de, et al. FIRST REPORT ON *Cryptococcus neoformans* IN PIGEON EXCRETA FROM PUBLIC AND RESIDENTIAL LOCATIONS IN THE METROPOLITAN AREA OF CUIABÁ, STATE OF MATO GROSSO, BRAZIL. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* dezembro de 2013;55(6):371–6.
57. Soares MCB, Paula CR, Dias ALT, Caseiro MM, Costa SOP da. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* fevereiro de 2005;47(1):31–6.
58. Lima CT de, Klafke GB, Xavier MO, Lima CT de, Klafke GB, Xavier MO. *Cryptococcus* spp. em excretas de *Columba livia* (pombos domésticos) provenientes de um hospital universitário no Sul do Brasil. *Arq Inst Biológico* [Internet]. 2015 [citado 28 de outubro de 2019];82. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1808-16572015000100321&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1808-16572015000100321&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)
59. Ferreira-Paim K, Andrade-Silva L, Mora DJ, Pedrosa AL, Rodrigues V, Silva-Vergara ML. Genotyping of *Cryptococcus neoformans* isolated from captive birds in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Mycoses.* setembro de 2011;54(5):e294-300.

60. Andrade-Silva L, Ferreira-Paim K, Mora DJ, da Silva PR, Andrade AA, Lages-Silva E, et al. RAPD analysis with the primer L15996 of Brazilian clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates. *Mycopathologia*. julho de 2012;174(1):53–9.
61. Teodoro VLI, Gullo FP, Sardi J de CO, Torres EM, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJS, et al. Environmental isolation, biochemical identification, and antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus* species. *Rev Soc Bras Med Trop*. dezembro de 2013;46(6):759–64.
62. Alves GSB, Freire AKL, Bentes ADS, Pinheiro JF de S, de Souza JVB, Wanke B, et al. Molecular typing of environmental *Cryptococcus neoformans*/C. *gattii* species complex isolates from Manaus, Amazonas, Brazil. *Mycoses*. agosto de 2016;59(8):509–15.
63. Passoni LFC, Wanke B, Nishikawa MM, Lazéra MS. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: an analysis of the domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. *Med Mycol*. 1º de janeiro de 1998;36(5):305–11.
64. Farias Filho L.P., Neves M.A., Souza-Castro G.B. & Fortes S.T. 2004. *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos em Boa Vista/RR. In: Anais do IV Congresso Brasileiro de Micologia. (Ouro Preto, Brasil). p.45 - Pesquisa Google [Internet]. [citado 28 de outubro de 2019]. Disponível em: [https://www.google.com.br/search?sxsrf=ACYBGNRxMUyD771lo0ccs6SP8bCAILy8Bg%3A1572298152051&source=hp&ei=qF23XdOUAfGm5OUP5oywyAg&q=Farias+Filho+L.P.%2C+Neves+M.A.%2C+Souza-Castro+G.B.+%26+Fortes+S.T.+2004.+Cryptococcus+neoformans+em+excretas+de+pombos+em+Boa+Vista%2FRR.+In%3A+Anais+do+IV+Congresso+Brasileiro+de+Micologia.+%28Ouro+Preto%2C+Brasil%29.+p.45&oq=Farias+Filho+L.P.%2C+Neves+M.A.%2C+Souza-Castro+G.B.+%26+Fortes+S.T.+2004.+Cryptococcus+neoformans+em+excretas+de+pombos+em+Boa+Vista%2FRR.+In%3A+Anais+do+IV+Congresso+Brasileiro+de+Micologia.+%28Ouro+Preto%2C+Brasil%29.+p.45&gs\\_l=psy-ab.3...992.992..1495...0.0..0.0.0.....0....2j1..gws-wiz.&ved=0ahUKEwjTiNSG87\\_IAhVxE7kGHWYGDikQ4dUDCAU&uact=5](https://www.google.com.br/search?sxsrf=ACYBGNRxMUyD771lo0ccs6SP8bCAILy8Bg%3A1572298152051&source=hp&ei=qF23XdOUAfGm5OUP5oywyAg&q=Farias+Filho+L.P.%2C+Neves+M.A.%2C+Souza-Castro+G.B.+%26+Fortes+S.T.+2004.+Cryptococcus+neoformans+em+excretas+de+pombos+em+Boa+Vista%2FRR.+In%3A+Anais+do+IV+Congresso+Brasileiro+de+Micologia.+%28Ouro+Preto%2C+Brasil%29.+p.45&oq=Farias+Filho+L.P.%2C+Neves+M.A.%2C+Souza-Castro+G.B.+%26+Fortes+S.T.+2004.+Cryptococcus+neoformans+em+excretas+de+pombos+em+Boa+Vista%2FRR.+In%3A+Anais+do+IV+Congresso+Brasileiro+de+Micologia.+%28Ouro+Preto%2C+Brasil%29.+p.45&gs_l=psy-ab.3...992.992..1495...0.0..0.0.0.....0....2j1..gws-wiz.&ved=0ahUKEwjTiNSG87_IAhVxE7kGHWYGDikQ4dUDCAU&uact=5)
65. Fortes ST, Lazéra MS, Nishikawa MM, Macedo RCL, Wanke B. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. *Mycoses*. 1º de julho de 2001;44(5):137–40.
66. Casadevall A. Fungal virulence, vertebrate endothermy, and dinosaur extinction: is there a connection? *Fungal Genet Biol*. 1º de fevereiro de 2005;42(2):98–106.
67. Dzik JM. The ancestry and cumulative evolution of immune reactions. *Acta Biochim Pol*. 2010;57(4):443–66.
68. Zaragoza O. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. *Virulence*. 2019;10(1):490–501.
69. Gates-Hollingsworth MA, Kozel TR. Phenotypic heterogeneity in expression of epitopes in the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Mol Microbiol*. 1º de outubro de 2009;74(1):126–38.

70. Ma H, Hagen F, Stekel DJ, Johnston SA, Sionov E, Falk R, et al. The fatal fungal outbreak on Vancouver Island is characterized by enhanced intracellular parasitism driven by mitochondrial regulation. *Proc Natl Acad Sci*. 4 de agosto de 2009;106(31):12980–5.
71. Buchanan KL, Murphy JW. What Makes *Cryptococcus neoformans* a Pathogen? - Volume 4, Number 1—March 1998 - *Emerging Infectious Diseases journal* - CDC. [citado 4 de novembro de 2019]; Disponível em: [https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/4/1/98-0109\\_article](https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/4/1/98-0109_article)
72. Kozel TR. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol*. 1º de agosto de 1995;3(8):295–9.
73. Casadevall A, Pirofski L. Accidental Virulence, Cryptic Pathogenesis, Martians, Lost Hosts, and the Pathogenicity of Environmental Microbes. *Eukaryot Cell*. dezembro de 2007;6(12):2169–74.
74. McClelland EE, Bernhardt P, Casadevall A. Estimating the Relative Contributions of Virulence Factors for Pathogenic Microbes. *Infect Immun*. 1º de março de 2006;74(3):1500–4.
75. Casadevall A, Coelho C, Cordero RJB, Dragotakes Q, Jung E, Vij R, et al. The capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Virulence*. 1º de janeiro de 2019;10(1):822–31.
76. Kozel TR, Cazin J. Nonencapsulated Variant of *Cryptococcus neoformans* I. Virulence Studies and Characterization of Soluble Polysaccharide. *Infect Immun*. 1º de fevereiro de 1971;3(2):287–94.
77. Vartivarian SE, Reyes GH, Jacobson ES, James PG, Cherniak R, Mumaw VR, et al. Localization of mannoprotein in *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol*. 1º de dezembro de 1989;171(12):6850–2.
78. Cherniak R, Reiss E, Turner SH. A galactoxylomannan antigen of *Cryptococcus neoformans* serotype A. *Carbohydr Res*. 16 de maio de 1982;103(2):239–50.
79. Granger DL, Perfect JR, Durack DT. Virulence of *Cryptococcus neoformans*. Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. *J Clin Invest*. 1º de agosto de 1985;76(2):508–16.
80. Vecchiarelli A, Pericolini E, Gabrielli E, Kenno S, Perito S, Cenci E, et al. Elucidating the immunological function of the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Future Microbiol*. 1º de setembro de 2013;8(9):1107–16.
81. Hardison SE, Brown GD. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nat Immunol*. setembro de 2012;13(9):817–22.
82. Geijtenbeek TBH, Gringhuis SI. C-type lectin receptors in the control of T helper cell differentiation. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(7):433–48.
83. Heung LJ. Innate Immune Responses to *Cryptococcus*. *J Fungi Basel Switz*. setembro de 2017;3(3).

84. Kronstad J, Saikia S, Nielson ED, Kretschmer M, Jung W, Hu G, et al. Adaptation of *Cryptococcus neoformans* to Mammalian Hosts: Integrated Regulation of Metabolism and Virulence. *Eukaryot Cell*. fevereiro de 2012;11(2):109–18.
85. Feldmesser M, Tucker S, Casadevall A. Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol*. 1º de junho de 2001;9(6):273–8.
86. Rodrigues ML, Nimrichter L, Oliveira DL, Frases S, Miranda K, Zaragoza O, et al. Vesicular Polysaccharide Export in *Cryptococcus neoformans* Is a Eukaryotic Solution to the Problem of Fungal Trans-Cell Wall Transport. *Eukaryot Cell*. janeiro de 2007;6(1):48–59.
87. Kumar P, Yang M, Haynes BC, Skowyra ML, Doering TL. Emerging themes in cryptococcal capsule synthesis. *Curr Opin Struct Biol*. 1º de outubro de 2011;21(5):597–602.
88. García-Rivera J, Chang YC, Kwon-Chung KJ, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* CAP59 (or Cap59p) Is Involved in the Extracellular Trafficking of Capsular Glucuronoxylomannan. *Eukaryot Cell*. abril de 2004;3(2):385–92.
89. Chang YC, Kwon-Chung KJ. Isolation, Characterization, and Localization of a Capsule-Associated Gene, CAP10, of *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol*. 15 de setembro de 1999;181(18):5636–43.
90. Yang D-H, Jung K-W, Bang S, Lee J-W, Song M-H, Floyd-Averette A, et al. Rewiring of Signaling Networks Modulating Thermotolerance in the Human Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Genetics*. 1º de janeiro de 2017;205(1):201–19.
91. Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. *FEMS Yeast Res*. 1º de junho de 2006;6(4):463–8.
92. Odom A, Muir S, Lim E, Toffaletti DL, Perfect J, Heitman J. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J*. 15 de maio de 1997;16(10):2576–89.
93. Nichols CB, Perfect ZH, Alspaugh JA. A Ras1-Cdc24 signal transduction pathway mediates thermotolerance in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*. 2007;63(4):1118–30.
94. Fu MS, Coelho C, Leon-Rodriguez CMD, Rossi DCP, Camacho E, Jung EH, et al. *Cryptococcus neoformans* urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH. *PLOS Pathog*. 15 de junho de 2018;14(6):e1007144.
95. Kwon-Chung KJ, Wickes BL, Booth JL, Vishniac HS, Bennett JE. Urease inhibition by EDTA in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 1º de agosto de 1987;55(8):1751–4.
96. Varma A, Wu S, Guo N, Liao W, Lu G, Li A, et al. Identification of a novel gene, URE2, that functionally complements a urease-negative clinical strain of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*. 2006;152(12):3723–31.

97. Cox GM, Mukherjee J, Cole GT, Casadevall A, Perfect JR. Urease as a Virulence Factor in Experimental Cryptococcosis. *Infect Immun*. 1º de fevereiro de 2000;68(2):443–8.
98. Hernandez Y, Arora S, Erb-Downward JR, McDonald RA, Toews GB, Huffnagle GB. Distinct Roles for IL-4 and IL-10 in Regulating T2 Immunity during Allergic Bronchopulmonary Mycosis. *J Immunol*. 15 de janeiro de 2005;174(2):1027–36.
99. Eaton KA, Brooks CL, Morgan DR, Krakowka S. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun*. julho de 1991;59(7):2470–5.
100. Shi M, Li SS, Zheng C, Jones GJ, Kim KS, Zhou H, et al. Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. *J Clin Invest*. 3 de maio de 2010;120(5):1683–93.
101. Singh A, Panting RJ, Varma A, Saijo T, Waldron KJ, Jong A, et al. Factors required for activation of urease as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans*. *mBio*. 7 de maio de 2013;4(3):e00220-00213.
102. Nosanchuk JD, Casadevall A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol*. 2003;5(4):203–23.
103. Rosa LH, Almeida Vieira M de L, Santiago IF, Rosa CA. Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) in Antarctica. *FEMS Microbiol Ecol*. 1º de julho de 2010;73(1):178–89.
104. Nosanchuk JD, Casadevall A. Impact of Melanin on Microbial Virulence and Clinical Resistance to Antimicrobial Compounds. *Antimicrob Agents Chemother*. 1º de novembro de 2006;50(11):3519–28.
105. Gómez BL, Nosanchuk JD. Melanin and fungi. *Curr Opin Infect Dis*. abril de 2003;16(2):91.
106. Dadachova E, Bryan RA, Huang X, Moadel T, Schweitzer AD, Aisen P, et al. Ionizing Radiation Changes the Electronic Properties of Melanin and Enhances the Growth of Melanized Fungi. *PLoS ONE* [Internet]. 23 de maio de 2007 [citado 25 de fevereiro de 2020];2(5). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1866175/>
107. Wang Y, Aisen P, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. *Infect Immun*. 1º de agosto de 1995;63(8):3131–6.
108. Nosanchuk JD, Stark RE, Casadevall A. Fungal Melanin: What do We Know About Structure? *Front Microbiol* [Internet]. 2015 [citado 4 de dezembro de 2019];6. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.01463/full>
109. Nosanchuk JD, Valadon P, Feldmesser M, Casadevall A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* in murine infection. *Mol Cell Biol*. janeiro de 1999;19(1):745–50.



110. Casadevall A, Rosas AL, Nosanchuk JD. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr Opin Microbiol*. 1º de agosto de 2000;3(4):354–8.
111. Rosas AL, Nosanchuk JD, Feldmesser M, Cox GM, McDade HC, Casadevall A. Synthesis of polymerized melanin by *Cryptococcus neoformans* in infected rodents. *Infect Immun*. maio de 2000;68(5):2845–53.
112. Eisenman HC, Casadevall A. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1º de fevereiro de 2012;93(3):931–40.
113. Ito-Kuwa S, Nakamura K, Valderrama B, Aoki S, Vidotto V, Osafune T. Diversity of laccase among *Cryptococcus neoformans* serotypes. *Microbiol Immunol*. 2008;52(10):492–8.
114. Pukkila-Worley R, Gerrald QD, Kraus PR, Boily M-J, Davis MJ, Giles SS, et al. Transcriptional network of multiple capsule and melanin genes governed by the *Cryptococcus neoformans* cyclic AMP cascade. *Eukaryot Cell*. janeiro de 2005;4(1):190–201.
115. Roemer T, Krysan DJ. Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 1º de maio de 2014;4(5).
116. Denning DW, Bromley MJ. Infectious Disease. How to bolster the antifungal pipeline. *Science*. 27 de março de 2015;347(6229):1414–6.
117. Castelli MV, Butassi E, Monteiro MC, Svetaz LA, Vicente F, Zacchino SA. Novel antifungal agents: a patent review (2011 - present). *Expert Opin Ther Pat*. março de 2014;24(3):323–38.
118. Campoy S, Adrio JL. Antifungals. *Biochem Pharmacol*. 01 de 2017;133:86–96.
119. Peng CA, Gaertner AAE, Henriquez SA, Fang D, Colon-Reyes RJ, Brumaghim JL, et al. Fluconazole induces ROS in *Cryptococcus neoformans* and contributes to DNA damage in vitro. *PLoS One*. 2018;13(12):e0208471.
120. Carrillo-Muñoz AJ, Giusiano G, Ezkurra PA, Quindós G. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev Espanola Quimioter Publicacion Of Soc Espanola Quimioter*. junho de 2006;19(2):130–9.
121. Odds FC, Brown AJP, Gow NAR. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol*. junho de 2003;11(6):272–9.
122. Bicanic T, Wood R, Meintjes G, Rebe K, Brouwer A, Loyse A, et al. High-dose amphotericin B with flucytosine for the treatment of cryptococcal meningitis in HIV-infected patients: a randomized trial. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1º de julho de 2008;47(1):123–30.
123. Herreros JMC, Matía EC. Therapeutic armamentarium against systemic fungal infections. *Clin Microbiol Infect*. 1º de dezembro de 2006;12:53–64.

124. Barrett JP, Vardulaki KA, Conlon C, Cooke J, Daza-Ramirez P, Evans EGV, et al. A systematic review of the antifungal effectiveness and tolerability of amphotericin B formulations. *Clin Ther.* 1º de maio de 2003;25(5):1295–320.
125. Bates DW, Su L, Yu DT, Chertow GM, Seger DL, Gomes DRJ, et al. Mortality and Costs of Acute Renal Failure Associated with Amphotericin B Therapy. *Clin Infect Dis.* 1º de março de 2001;32(5):686–93.
126. Hamill RJ. Amphotericin B Formulations: A Comparative Review of Efficacy and Toxicity. *Drugs.* 1º de junho de 2013;73(9):919–34.
127. González GM, Tijerina R, Najvar LK, Bocanegra R, Rinaldi MG, Graybill JR. Efficacies of Amphotericin B (AMB) Lipid Complex, AMB Colloidal Dispersion, Liposomal AMB, and Conventional AMB in Treatment of Murine Coccidioidomycosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1º de junho de 2004;48(6):2140–3.
128. Bekersky I, Fielding RM, Dressler DE, Lee JW, Buell DN, Walsh TJ. Pharmacokinetics, Excretion, and Mass Balance of Liposomal Amphotericin B (AmBisome) and Amphotericin B Deoxycholate in Humans. *Antimicrob Agents Chemother.* 1º de março de 2002;46(3):828–33.
129. Sidrim: Micologia médica à luz de autores contemporâneos - Google Acadêmico [Internet]. [citado 9 de dezembro de 2019]. Disponível em: [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=+Micologia+m%C3%A9dica+%C3%A0+luz+de+autores+contempor%C3%A2neos&author=SIDRIM+J.J.C.&author=ROCHA+M.F.G.&publication\\_year=2004](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=+Micologia+m%C3%A9dica+%C3%A0+luz+de+autores+contempor%C3%A2neos&author=SIDRIM+J.J.C.&author=ROCHA+M.F.G.&publication_year=2004)
130. Filippin FB, Souza LC. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Rev Bras Ciênc Farm.* junho de 2006;42(2):167–94.
131. Francis P, Walsh TJ. Evolving Role of Flucytosine in Immunocompromised Patients: New Insights into Safety, Pharmacokinetics, and Antifungal Therapy. *Clin Infect Dis.* 1º de dezembro de 1992;15(6):1003–18.
132. Bossche HV, Willemsens G, Marichal P. Anti-Candida Drugs — The Biochemical Basis for Their Activity. *CRC Crit Rev Microbiol.* 1º de janeiro de 1987;15(1):57–72.
133. Benson JM, Nahata MC. Clinical use of systemic antifungal agents. *Clin Pharm.* junho de 1988;7(6):424–38.
134. Vermes A, Guchelaar H-J, Dankert J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother.* 1º de agosto de 2000;46(2):171–9.
135. Yonga G. Current drug therapy of systemic mycoses: a review. *East Afr Med J.* junho de 1995;72(6):394–8.

136. Moreira MEL. Controvérsias a respeito da sepse fúngica no pré-termo extremo: profilaxia e esquemas terapêuticos. *J Pediatr (Rio J)*. março de 2005;81(1):S52–8.
137. Martinez R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. *J Bras Pneumol*. outubro de 2006;32(5):449–60.
138. Como JA, Dismukes WE. Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. *N Engl J Med*. 27 de janeiro de 1994;330(4):263–72.
139. Maertens JA. History of the development of azole derivatives. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. março de 2004;10 Suppl 1:1–10.
140. Thorpe JE, Baker N, Bromet-Petit M. Effect of Oral Antacid Administration on the Pharmacokinetics of Oral Fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. outubro de 1990;34(10):2032–3.
141. Salas SD, Bennett JE, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Williamson PR. Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Exp Med*. 1º de agosto de 1996;184(2):377–86.
142. Brion LP, Uko SE, Goldman DL. Risk of resistance associated with fluconazole prophylaxis: Systematic review. *J Infect*. 1º de junho de 2007;54(6):521–9.
143. Bongomin F, Oladele RO, Gago S, Moore CB, Richardson MD. A systematic review of fluconazole resistance in clinical isolates of *Cryptococcus* species. *Mycoses*. 2018;61(5):290–7.
144. Arathoon EG. Clinical efficacy of echinocandin antifungals. *Curr Opin Infect Dis*. dezembro de 2001;14(6):685–691.
145. Eliopoulos GM, Perea S, Patterson TF. Antifungal Resistance in Pathogenic Fungi. *Clin Infect Dis*. 1º de novembro de 2002;35(9):1073–80.
146. Lass-Flörl C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses*. 2009;52(3):197–205.
147. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1º de abril de 1998;11(2):382–402.
148. Pfaller MA. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. *Am J Med*. 1º de janeiro de 2012;125(1, Supplement):S3–13.
149. Martinez LR, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* Cells in Biofilms Are Less Susceptible than Planktonic Cells to Antimicrobial Molecules Produced by the Innate Immune System. *Infect Immun*. 1º de novembro de 2006;74(11):6118–23.
150. Sanglard D, Ischer F, Parkinson T, Falconer D, Bille J. *Candida albicans* Mutations in the Ergosterol Biosynthetic Pathway and Resistance to Several Antifungal Agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 1º de agosto de 2003;47(8):2404–12.

151. Geber A, Hitchcock CA, Swartz JE, Pullen FS, Marsden KE, Kwon-Chung KJ, et al. Deletion of the *Candida glabrata* ERG3 and ERG11 genes: effect on cell viability, cell growth, sterol composition, and antifungal susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 1º de dezembro de 1995;39(12):2708–17.
152. Sokol-Anderson ML, Brajtburg J, Medoff G. Amphotericin B-Induced Oxidative Damage and Killing of *Candida albicans*. *J Infect Dis*. 1º de julho de 1986;154(1):76–83.
153. Sokol-Anderson M, Sligh JE, Elberg S, Brajtburg J, Kobayashi GS, Medoff G. Role of cell defense against oxidative damage in the resistance of *Candida albicans* to the killing effect of amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother*. 1º de maio de 1988;32(5):702–5.
154. Sanguinetti M, Posteraro B, La Sorda M, Torelli R, Fiori B, Santangelo R, et al. Role of AFR1, an ABC Transporter-Encoding Gene, in the In Vivo Response to Fluconazole and Virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. fevereiro de 2006;74(2):1352–9.
155. Brandt ME, Pfaller MA, Hajjeh RA, Hamill RJ, Pappas PG, Reingold AL, et al. Trends in Antifungal Drug Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* Isolates in the United States: 1992 to 1994 and 1996 to 1998. *Antimicrob Agents Chemother*. 1º de novembro de 2001;45(11):3065–9.
156. Spitzer M, Griffiths E, Blakely KM, Wildenhain J, Ejim L, Rossi L, et al. Cross-species discovery of syncretic drug combinations that potentiate the antifungal fluconazole. *Mol Syst Biol*. 1º de janeiro de 2011;7(1):499.
157. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ, et al. Global Trends in the Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). *J Clin Microbiol*. 1º de maio de 2005;43(5):2163–7.
158. Pappalardo MCSM, Melhem MSC. Criptococose: revisão sobre a experiência brasileira sobre a doença. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. dezembro de 2003;45(6):299–305.
159. Matos CS, de Souza Andrade A, Oliveira NS, Barros TF. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus* spp. in Bahia, Brazil: molecular types and antifungal susceptibilities. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1º de julho de 2012;31(7):1647–52.
160. Trilles L, Fernández-Torres B, Lazéra M dos S, Wanke B, Guarro J. In Vitro Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus gattii*. *J Clin Microbiol*. 1º de outubro de 2004;42(10):4815–7.
161. Torres-Rodríguez JM, Alvarado-Ramírez E, Murciano F, Sellart M. MICs and minimum fungicidal concentrations of posaconazole, voriconazole and fluconazole for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *J Antimicrob Chemother*. 1º de julho de 2008;62(1):205–6.
162. Vale-Silva LA, Buchta V. Antifungal susceptibility testing by flow cytometry: is it the future? *Mycoses*. 2006;49(4):261–73.

163. Zaragoza O, Mesa-Arango AC, Gómez-López A, Bernal-Martínez L, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Process Analysis of Variables for Standardization of Antifungal Susceptibility Testing of Nonfermentative Yeasts. *Antimicrob Agents Chemother.* 1º de abril de 2011;55(4):1563–70.
164. Forrest G. Role of antifungal susceptibility testing in patient management. *Curr Opin Infect Dis.* dezembro de 2006;19(6):538.
165. Gulluce M, Aslan A, Sokmen M, Sahin F, Adiguzel A, Agar G, et al. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*. *Phytomedicine.* 10 de julho de 2006;13(7):515–21.
166. Wayne: Reference method for broth dilution antifungal... - Google Acadêmico [Internet]. [citado 20 de dezembro de 2019]. Disponível em: [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Reference+method+for+broth+dilution+antifungal+susceptibility+testing+of+yeasts:+approved+standard.+M27-A3.+3rd+ed&publication\\_year=2008&journal=Wayne,+PA:+Clinical+and+Laboratory+Standards+Institute](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Reference+method+for+broth+dilution+antifungal+susceptibility+testing+of+yeasts:+approved+standard.+M27-A3.+3rd+ed&publication_year=2008&journal=Wayne,+PA:+Clinical+and+Laboratory+Standards+Institute)
167. Arendrup MC, Meletiadis J, Mouton JW, Guinea J, Cuenca-Estrella M, Lagrou K, et al. EUCAST technical note on isavuconazole breakpoints for *Aspergillus*, itraconazole breakpoints for *Candida* and updates for the antifungal susceptibility testing method documents. *Clin Microbiol Infect.* 1º de junho de 2016;22(6):571.e1-571.e4.
168. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference... - Google Acadêmico [Internet]. [citado 23 de dezembro de 2019]. Disponível em: [https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&as\\_sdt=0%2C5&q=Clinical+and+Laboratory+Standards+Institute.+Reference+Method+for+Broth+Dilution+Antifungal+Susceptibility+Testing+of+Yeasts%3B+Approved+Standard.+CLSI+document+M27-A.+Wayne%3A+Clinical+and+Laboratory+Standards+Institute%3B+1997.&btnG=](https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&as_sdt=0%2C5&q=Clinical+and+Laboratory+Standards+Institute.+Reference+Method+for+Broth+Dilution+Antifungal+Susceptibility+Testing+of+Yeasts%3B+Approved+Standard.+CLSI+document+M27-A.+Wayne%3A+Clinical+and+Laboratory+Standards+Institute%3B+1997.&btnG=)
169. Alastruey-Izquierdo A, Melhem MSC, Bonfietti LX, Rodriguez-Tudela JL, Alastruey-Izquierdo A, Melhem MSC, et al. Teste de suscetibilidade para fungos: correlações clínico-laboratoriais em Micologia médica. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* setembro de 2015;57:57–64.
170. Wayne P. Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. *CLSI Doc M27-A3 Suppl S.* 2008;3:6–12.
171. Rodriguez-Tudela JL, Donnelly JP, Pfaller MA, Chryssantou E, Warn P, Denning DW, et al. Statistical Analyses of Correlation between Fluconazole MICs for *Candida* spp. Assessed by Standard Methods Set Forth by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (E.Dis. 7.1) and CLSI (M27-A2). *J Clin Microbiol.* 1º de janeiro de 2007;45(1):109–11.
172. Cuenca-Estrella M, Moore CB, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Denning DW, et al. Multicenter evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility testing

method for fermentative yeasts of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST). *Clin Microbiol Infect.* 2003;9(6):467–74.

173. Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Moet GJ, Jones RN. 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.* 1º de janeiro de 2011;69(1):45–50.
174. Reichert-Lima F, Busso-Lopes AF, Lyra L, Peron IH, Taguchi H, Mikami Y, et al. Evaluation of antifungal combination against *Cryptococcus* spp. *Mycoses.* 2016;59(9):585–93.
175. Vandebossche I, Vaneechoutte M, Vandevenne M, Baere TD, Verschraegen G. Susceptibility Testing of Fluconazole by the NCCLS Broth Macrodilution Method, E-Test, and Disk Diffusion for Application in the Routine Laboratory. *J Clin Microbiol.* 1º de março de 2002;40(3):918–21.
176. Johnson EM. Issues in antifungal susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother.* 1º de janeiro de 2008;61(suppl\_1):i13–8.
177. Espinel-Ingroff A, Chowdhary A, Cuenca-Estrella M, Fothergill A, Fuller J, Hagen F, 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. *Antimicrob Agents Chemother.* 1º de junho de 2012;56(6):3107–13.
178. Espinel-Ingroff A, Aller AI, Canton E, Castañón-Olivares LR, Chowdhary A, Córdoba S, et al. *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* Species Complex: an International Study of Wild-Type Susceptibility Endpoint Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 1º de novembro de 2012;56(11):5898–906.
179. McTaggart LR, Lei E, Richardson SE, Hoang L, Fothergill A, Zhang SX. Rapid Identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 1º de agosto de 2011;49(8):3050–3.
180. Sandrin TR, Goldstein JE, Schumaker S. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: A review. *Mass Spectrom Rev.* 2013;32(3):188–217.
181. Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clin Chem.* janeiro de 2015;61(1):100–11.
182. Bryson AL, Hill EM, Doern CD. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight: The Revolution in Progress. *Clin Lab Med.* setembro de 2019;39(3):391–404.

183. Bourbeau PP, Ledebor NA. Automation in Clinical Microbiology. J Clin Microbiol. 1º de junho de 2013;51(6):1658–65.
184. Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T, et al. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 1988;2(8):151–3.
185. Carbonnelle É, Nassif X. Utilisation en routine du MALDI-TOF-MS pour l'identification des pathogènes en microbiologie médicale. médecine/sciences. 1º de outubro de 2011;27(10):882–8.
186. Cassagne C, Normand A-C, L'Ollivier C, Ranque S, Piarroux R. Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. Mycoses. novembro de 2016;59(11):678–90.
187. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. FEMS Microbiol Rev. 1º de março de 2012;36(2):380–407.
188. IBGE | Cidades@ | Roraima | Panorama [Internet]. [citado 3 de janeiro de 2020]. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rr/panorama>
189. IBGE | Cidades@ | Roraima | Boa Vista | Panorama [Internet]. [citado 3 de janeiro de 2020]. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rr/boa-vista/panorama>
190. Ferreira M de F, Brito-Santos F, Trilles L, Almeida MA, Wanke B, Veloso VG, et al. Cryptococcal antigenemia prevalence and clinical data in HIV-infected patients from the reference centre at INI-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Southeast of Brazil. Mycoses [Internet]. [citado 2 de janeiro de 2020];n/a(n/a). Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/myc.13032>
191. Silva JO, Capuano DM. Ocorrência de *Cryptococcus* spp e de parasitas de interesse em saúde pública, nos excretas de pombos na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. Rev Inst Adolfo Lutz Impresso. agosto de 2008;67(2):137–41.
192. Contin JT, Quaresma G da S, Silva EF da, Linardi VR. Ocorrência de *cryptococcus neoformans* em fezes de pombos na cidade de Caratinga, MG - Brasil. 21(1):19–24.
193. Siqueira LPM, Gimenes VMF, de Freitas RS, Melhem M de SC, Bonfietti LX, da Silva AR, et al. Evaluation of Vitek MS for Differentiation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Genotypes. J Clin Microbiol. 2019;57(1).
194. Staib F. *Cryptococcus neoformans* and *Guizotia abyssinica* (syn. *G. oleifera* D.C.). (Colour reaction for *Cr. neoformans*). Z Hyg Infektionskr. 1962;148(5):466–75.
195. O'Meara TR, Alspaugh JA. The *Cryptococcus neoformans* Capsule: a Sword and a Shield. Clin Microbiol Rev. 1º de julho de 2012;25(3):387–408.

196. Reis FCG, Borges BS, Jozefowicz LJ, Sena BAG, Garcia AWA, Medeiros LC, et al. A Novel Protocol for the Isolation of Fungal Extracellular Vesicles Reveals the Participation of a Putative Scramblase in Polysaccharide Export and Capsule Construction in *Cryptococcus gattii*. *mSphere* [Internet]. 24 de abril de 2019 [citado 7 de janeiro de 2020];4(2). Disponível em: <https://msphere.asm.org/content/4/2/e00080-19>
197. Casadevall A, Mukherjee J, Scharff MD. Monoclonal antibody based ELISAs for cryptococcal polysaccharide. *J Immunol Methods*. 18 de setembro de 1992;154(1):27–35.
198. Nimrichter L, Frases S, Cinelli LP, Viana NB, Nakouzi A, Travassos LR, et al. Self-Aggregation of *Cryptococcus neoformans* Capsular Glucuronoxylomannan Is Dependent on Divalent Cations. *Eukaryot Cell*. 1º de agosto de 2007;6(8):1400–10.
199. Rocha DFS, Cruz KS, Santos CS da S, Menescal LSF, Neto JR da S, Pinheiro SB, et al. MLST reveals a clonal population structure for *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI isolates from clinical sources in Amazonas, Northern-Brazil. *PLOS ONE*. 8 de junho de 2018;13(6):e0197841.
200. Khell Da Silva B, Freire AK, Dos Santos Bentes A, De Lima Sampaio I, Oliveira Santos L, Silva Dos Santos M, et al. Characterization of clinical isolates of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex from the Amazonas State in Brazil. *Rev Iberoam Micol*. 1º de janeiro de 2012;29(1):40–3.
201. Swinne-Desgain D. *Cryptococcus neoformans* in the crops of pigeons following its experimental administration. *Sabouraudia*. 1º de novembro de 1976;14(3):313–7.
202. Rosario I, Mendoza MH de, Déniz S, Soro G, Álamo I, Acosta B. Isolation of *Cryptococcus* species including *C. neoformans* from cloaca of pigeons. *Mycoses*. 2005;48(6):421–4.
203. Costa AKF, Sidrim JJC, Cordeiro RA, Brilhante RSN, Monteiro AJ, Rocha MFG. Urban Pigeons (*Columba livia*) as a Potential Source of Pathogenic Yeasts: A Focus on Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus* Strains in Northeast Brazil. *Mycopathologia*. 1º de março de 2010;169(3):207–13.
204. Filiú WF de O, Wanke B, Agüena SM, Vilela VO, Macedo RCL, Lazéra M. Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. dezembro de 2002;35(6):591–5.
205. Levitz SM. The Ecology of *Cryptococcus neoformans* and the Epidemiology of Cryptococcosis. *Rev Infect Dis*. 1º de novembro de 1991;13(6):1163–9.
206. Trilles L, Lazéra M dos S, Wanke B, Oliveira RV, Barbosa GG, Nishikawa MM, et al. [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0074-02762008000500008&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0074-02762008000500008&lng=en&nrm=iso&tlng=es). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. agosto de 2008;103(5):455–62.



207. Meyer W, Gilgado F, Ngamskulrungrroj P, Trilles L, Hagen F, Castañeda E, et al. Molecular Typing of the *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* Species Complex. *Cryptococcus*. 1º de janeiro de 2011;327–57.
208. Nunes J de O, Tsujisaki RA de S, Nunes M de O, Lima GME, Paniago AMM, Pontes ERJC, et al. Cryptococcal meningitis epidemiology: 17 years of experience in a State of the Brazilian Pantanal. *Rev Soc Bras Med Trop*. agosto de 2018;51(4):485–92.
209. Cafarchia C, Romito D, Iatta R, Camarda A, Montagna MT, Otranto D. Role of birds of prey as carriers and spreaders of *Cryptococcus neoformans* and other zoonotic yeasts. *Med Mycol*. 1º de setembro de 2006;44(6):485–92.
210. Montenegro H, Paula CR. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. *Med Mycol*. 1º de janeiro de 2000;38(5):385–90.
211. Abegg MA, Cella FL, Faganello J, Valente P, Schrank A, Vainstein MH. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Isolated from the Excreta of Psittaciformes in a Southern Brazilian Zoological Garden. *Mycopathologia*. 1º de fevereiro de 2006;161(2):83–91.
212. Lugarini C, Goebel CS, Condas LAZ, Muro MD, de Farias MR, Ferreira FM, et al. *Cryptococcus neoformans* Isolated from Passerine and Psittacine Bird Excreta in the State of Paraná, Brazil. *Mycopathologia*. 1º de agosto de 2008;166(2):61–9.
213. Baroni F de A, Paula CR, Silva ÉG da, Viani FC, Rivera ING, Oliveira MTB de, et al. [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0036-46652006000200003&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0036-46652006000200003&lng=en&nrm=iso&tlng=es). *Rev Inst Med Trop São Paulo*. abril de 2006;48(2):71–5.
214. Reolon A, Perez LRR, Mezzari A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *J Bras Patol E Med Lab*. outubro de 2004;40(5):293–8.
215. Ellabib MS, Aboshkiwa MA, Husien WM, D'Amicis R, Cogliati M. Isolation, Identification and Molecular Typing of *Cryptococcus neoformans* from Pigeon Droppings and Other Environmental Sources in Tripoli, Libya. *Mycopathologia*. 1º de agosto de 2016;181(7):603–8.
216. Ribas RC, Baeza LC, Ribeiro FH das M. ISOLATION OF *Cryptococcus* spp. IN EXCREMENTS OF PIGEONS (*Columba* sp.) IN THE MARINGÁ CITY, PR, BRAZIL. *Arq Ciênc Saúde UNIPAR* [Internet]. 2011 [citado 9 de maio de 2020];15(1). Disponível em: <https://revistas.unipar.br/index.php/saude/article/view/3691>
217. Ishaq CM, Bulmer GS, Felton FG. An evaluation of various environmental factors affecting the propagation of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathol Mycol Appl*. 12 de julho de 1968;35(2):81–90.

218. Camacho E, Casadevall A. Cryptococcal Traits Mediating Adherence to Biotic and Abiotic Surfaces. *J Fungi*. setembro de 2018;4(3):88.
219. Araujo G de S, Fonseca FL, Pontes B, Torres A, Cordero RJB, Zancopé-Oliveira RM, et al. Capsules from Pathogenic and Non-Pathogenic *Cryptococcus* spp. Manifest Significant Differences in Structure and Ability to Protect against Phagocytic Cells. *PLOS ONE*. 12 de janeiro de 2012;7(1):e29561.
220. Casadevall A, Cleare W, Feldmesser M, Glatman-Freedman A, Goldman DL, Kozel TR, et al. Characterization of a Murine Monoclonal Antibody to *Cryptococcus neoformans* Polysaccharide That Is a Candidate for Human Therapeutic Studies. *Antimicrob Agents Chemother*. 1º de junho de 1998;42(6):1437–46.
221. Sabiiti W, Robertson E, Beale MA, Johnston SA, Brouwer AE, Loyse A, et al. Efficient phagocytosis and laccase activity affect the outcome of HIV-associated cryptococcosis. *J Clin Invest*. 1º de maio de 2014;124(5):2000–8.
222. Rosas ÁL, Casadevall A. Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *FEMS Microbiol Lett*. 1º de agosto de 1997;153(2):265–72.
223. Ikeda R, Sugita T, Jacobson ES, Shinoda T. Effects of Melanin upon Susceptibility of *Cryptococcus* to Antifungals. *Microbiol Immunol*. 2003;47(4):271–7.
224. Zaragoza O, Rodrigues ML, De Jesus M, Frases S, Dadachova E, Casadevall A. Chapter 4 The Capsule of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. In: *Advances in Applied Microbiology* [Internet]. Academic Press; 2009 [citado 13 de janeiro de 2020]. p. 133–216. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065216409012040>
225. Cleare W, Cherniak R, Casadevall A. In Vitro and In Vivo Stability a *Cryptococcus neoformans* Glucuronoxylomannan Epitope That Elicits Protective Antibodies. *Infect Immun*. 1º de junho de 1999;67(6):3096–107.
226. Garcia-Hermoso D, Dromer F, Janbon G. *Cryptococcus neoformans* Capsule Structure Evolution In Vitro and during Murine Infection. *Infect Immun*. 1º de junho de 2004;72(6):3359–65.
227. Probert M, Zhou X, Goodall M, Johnston SA, Bielska E, Ballou ER, et al. Redistribution of a glucuronoxylomannan epitope towards the capsule surface coincides with Titanisation in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *bioRxiv*. 1º de outubro de 2018;431650.
228. Maxson ME, Cook E, Casadevall A, Zaragoza O. The volume and hydration of the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *Fungal Genet Biol*. 1º de março de 2007;44(3):180–6.
229. Gates MA, Thorkildson P, Kozel TR. Molecular architecture of the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Mol Microbiol*. 2004;52(1):13–24.

230. Esher SK, Zaragoza O, Alspaugh JA, Esher SK, Zaragoza O, Alspaugh JA. Cryptococcal pathogenic mechanisms: a dangerous trip from the environment to the brain. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2018 [citado 13 de janeiro de 2020];113(7). Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0074-02762018000700204&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0074-02762018000700204&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
231. Oliveira DL, Rizzo J, Joffe LS, Godinho RMC, Rodrigues ML. Where Do They Come from and Where Do They Go: Candidates for Regulating Extracellular Vesicle Formation in Fungi. *Int J Mol Sci*. maio de 2013;14(5):9581–603.
232. Chen SC-A, Playford EG, Sorrell TC. Antifungal therapy in invasive fungal infections. *Curr Opin Pharmacol*. 1º de outubro de 2010;10(5):522–30.
233. Arendrup MC, Sulim S, Holm A, Nielsen L, Nielsen SD, Knudsen JD, et al. Diagnostic Issues, Clinical Characteristics, and Outcomes for Patients with Fungemia. *J Clin Microbiol*. 1º de setembro de 2011;49(9):3300–8.
234. Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. The current role of the reference procedures by CLSI and EUCAST in the detection of resistance to antifungal agents in vitro. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 1º de março de 2010;8(3):267–76.
235. Pfaller MA, Messer SA, Karlsson \AA, Bolmström A. Evaluation of the Etest method for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeast isolates by using three different agar media. *J Clin Microbiol*. 1998;36(9):2586–2589.
236. Souza LKH, Fernandes O de FL, Kobayashi CCBA, Passos XS, Costa CR, Lemos JA, et al. Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Goiânia city, Goiás, Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. outubro de 2005;47(5):253–6.
237. Joseph-Horne T, Hollomon D, Loeffler RST, Kelly SL. Altered P450 activity associated with direct selection for fungal azole resistance. *FEBS Lett*. 1995;374(2):174–8.
238. Dick JD, Merz WG, Saral R. Incidence of polyene-resistant yeasts recovered from clinical specimens. *Antimicrob Agents Chemother*. 1º de julho de 1980;18(1):158–63.
239. Kelly SL, Lamb DC, Taylor M, Corran AJ, Baldwin BC, Powderly WG. Resistance to amphotericin B associated with defective sterol  $\Delta 8 \rightarrow 7$  isomerase in a *Cryptococcus neoformans* strain from an AIDS patient. *FEMS Microbiol Lett*. 1º de setembro de 1994;122(1–2):39–42.
240. Powderly WG, Kobayashi GS, Herzig GP, Medoff G. Amphotericin B-resistant yeast infection in severely immunocompromised patients. *Am J Med*. 1º de maio de 1988;84(5):826–32.
241. Cruz MC, Cavallo LM, Görlach JM, Cox G, Perfect JR, Cardenas ME, et al. Rapamycin Antifungal Action Is Mediated via Conserved Complexes with FKBP12 and TOR Kinase Homologs in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Cell Biol*. 1º de junho de 1999;19(6):4101–12.

242. Nishikawa MM, Almeida-Paes R, Brito-Santos F, Nascimento CR, Fialho MM, Trilles L, et al. Comparative antifungal susceptibility analyses of *Cryptococcus neoformans* VNI and *Cryptococcus gattii* VGII from the Brazilian Amazon Region by the Etest, Vitek 2, and the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods. *Med Mycol.* 1º de outubro de 2019;57(7):864–73.
243. Trilles L, Meyer W, Wanke B, Guarro J, Lazéra M. Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans*/C. *gattii* species complex. *Med Mycol.* 1º de abril de 2012;50(3):328–32.
244. Perfect JR, Bicanic T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. *Fungal Genet Biol.* 1º de maio de 2015;78:49–54.