

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS  
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

FELIPE ALMEIDA DA SILVA

**GENÉTICA POPULACIONAL E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE ISOLADOS  
BRASILEIROS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE *Cryptococcus neoformans***

Rio de Janeiro  
2020

FELIPE ALMEIDA DA SILVA

**GENÉTICA POPULACIONAL E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE ISOLADOS  
BRASILEIROS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE *Cryptococcus neoformans***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Luciana Trilles

Coorientador: Dr. Bodo Wanke

Rio de Janeiro

2020

Almeida da Silva, Felipe.

Genética populacional e epidemiologia molecular de isolados brasileiros clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans* / Felipe Almeida da Silva. - Rio de Janeiro, 2020.

xvi; 95 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2020.

Orientadora: Luciana Trilles.

Co-orientador: Bodo Wanke.

Bibliografia: f. 76-95

1. Criptococose. 2. *Cryptococcus neoformans*. 3. Multilocus Sequence Typing. 4. MLST. 5. Epidemiologia molecular. I. Título.

FELIPE ALMEIDA DA SILVA

**GENÉTICA POPULACIONAL E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE ISOLADOS  
BRASILEIROS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE *Cryptococcus neoformans***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Luciana Trilles

Coorientador: Dr. Bodo Wanke

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa. Dra. Cláudia Vera Pizzini (Presidente)**

Doutora em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas  
INI – Fiocruz

---

**Prof. Dr. Fábio Brito dos Santos**

Doutor em Medicina Tropical  
IOC – Fiocruz

---

**Prof. Dr. Allan Jefferson Guimarães**

Doutor em Ciências Biomédicas  
UFF

---

**Profa. Dra. Isabel Cristina Fábregas Bonna (Revisora/Suplente)**

PDCFMA – Fiocruz

*“A vida é uma sequência de encontros inéditos com o mundo, e, portanto, ela não se deixa traduzir em fórmulas de nenhuma espécie.”*

**Clóvis de Barros Filho**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha família, por ser meu alicerce, e que apesar da minha ausência continuaram incentivando e apoiando todos os meus passos. Em especial, agradeço a Heloisa Almeida, minha mãe, que além de promover os recursos necessários para a minha educação, sempre me motivou na construção da minha vida, como modelo pessoal e profissional. Agradeço também a Juliana Vitoria, por ter sido a minha maior companheira de vida nos últimos anos, me apoiando nas situações mais difíceis e compartilhando dos melhores momentos da minha vida.

Agradeço aos professores, peças fundamentais na minha formação pessoal e profissional, que com muito amor e dedicação compartilham seus saberes com seus alunos, e me inspiram a seguir na belíssima carreira que é a docência. Em especial, aos grandes micologistas Bodo Wanke, Marcia dos Santos Lazéra, Rosely Maria Zancopé Oliveira, Rodrigo de Almeida Paes, Paulo Murillo Neufeld, Ana Cristina Rivas, Luiz Henrique dos Santos e Diana Bridon da Graça Sgarbi, por todo o conhecimento transmitido, de forma direta ou indireta.

Aos amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, em especial, Carla Gomes, Fábio Brito, Isabel Cristina, Marcos de Abreu, Maria Helena Galdino, Mauro Muniz, Mônica dos Santos, Rosani Reis e demais alunos de estágio, iniciação científica, mestrado e doutorado, sempre dispostos a ajudar, realizando com perfeição suas funções e mantendo um harmonioso ambiente de cooperação e amizade. Agradeço aos meus orientadores, Luciana Trilles e Bodo Wanke, sem os quais essa conquista não seria possível.

**A TODOS, MUITO OBRIGADO!**

## RESUMO

A criptococose é uma micose sistêmica causada pelos complexos de espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. São estimados mais de 223 mil casos de criptococose por ano no mundo em indivíduos com HIV/aids, cerca de cinco mil apenas na América Latina, sendo o Brasil um dos países com maior incidência. O aumento dos casos potencialmente fatais e a emergência de epidemias justificam a necessidade da vigilância epidemiológica da doença. São reconhecidos cinco sorotipos e oito tipos moleculares principais para os agentes da criptococose: Os sorotipos A, AD e D, tipos moleculares VNI – VNIV, para *C. neoformans*, e sorotipos B e C, tipos moleculares VGI – VGIV, para *C. gattii*, e recentemente, centenas de subtipos moleculares (ST) foram descobertos a partir do sequenciamento de diversos *loci*. Estes STs apresentam diferenças clínicas e eco-epidemiológicas importantes, como variações na distribuição geográfica, prevalência, virulência, resistência aos antimicrobianos, taxas de mortalidade e prognóstico da infecção, justificando assim a sua significância. O presente estudo teve como objetivo identificar subtipos genéticos descritos na literatura como mais virulentos e/ou resistentes aos fármacos antifúngicos, visando uma melhor compreensão da estrutura genética populacional do complexo *C. neoformans* no Brasil. Para isso, foram analisados 64 isolados clínicos (de 48 indivíduos) e 15 isolados ambientais de *C. neoformans* (n=79). A identificação dos STs foi realizada utilizando o esquema *Multilocus Sequence Typing* (MLST), proposto pela ISHAM. Os isolados analisados foram identificados como: ST2 (n=1), ST5 (n=9), ST23 (n=4), ST32 (n=2), ST40 (n=10), ST41 (n=1), ST63 (n=1), ST77 (n=4), ST93 (n=45) e ST232 (n=2). Dentre os isolados, 72 foram identificados como tipo sexual MAT-alpha e 7 (todos clínicos) foram identificados como tipo sexual MAT-alpha/a. O ST93, identificado como o mais prevalente na população estudada, é descrito na literatura como um dos mais prevalentes em todo o mundo, além de estar associado a alta mortalidade em Uganda, a uma maior mortalidade no Sudeste do Brasil e a resistência aos fármacos antifúngicos anfotericina B e itraconazol. Acerca dos outros genótipos identificados no presente estudo, é descrito na literatura que: ST5 é um dos STs mais virulentos na Ásia, ST32 está relacionado a uma pior sobrevivência após um ano de infecção, ST40 aparentemente apresenta alta atividade da enzima lacase e boa sobrevivência no líquido e o tipo VNB (representado neste estudo pelo ST232) apresenta maior virulência, além de estar relacionado a maior mortalidade e raro isolamento fora do continente africano. No presente estudo, com

as ferramentas utilizadas foi possível concluir que a estrutura populacional das cepas brasileiras de *C. neoformans* estudada é altamente clonal e sem recombinação genética. Além disso, esta é a primeira descrição da identificação de cepas VNB no estado do Rio de Janeiro, sendo também o seu primeiro isolamento clínico no Brasil. A identificação destes genótipos potencialmente mais virulentos, mais resistentes aos fármacos antifúngicos e de pior prognóstico clínico justificam a necessidade de ampliar os estudos clínico-epidemiológicos da criptococose no Brasil e no mundo, para o monitoramento dos genótipos circulantes e consolidação da vigilância epidemiológica em nosso País.

**Palavras-chave:** Criptococose; *Cryptococcus neoformans*; Multilocus Sequence Typing; MLST; Epidemiologia molecular.



## ABSTRACT

Cryptococcosis is a systemic mycosis caused by complexes of species *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. More than 223 thousand cases of cryptococcosis are estimated per year in the world in individuals with HIV/Aids, about five thousand in Latin America alone, with Brazil being one of the countries with the highest incidence. The increase in potentially fatal cases and the emergence of epidemics justify the need for epidemiological surveillance of the disease. Five serotypes and eight major molecular types are recognized for cryptococcosis agents: Serotypes A, AD and D, molecular types VNI - VNIV, for *C. neoformans*, and serotypes B and C, molecular types VGI - VGIV, for *C. gattii*, and recently, hundreds of molecular subtypes (ST) have been discovered from the sequencing of several loci. These STs present important clinical and eco-epidemiological differences, such as variations in geographical distribution, prevalence, virulence, resistance to antimicrobials, mortality rates and prognosis of the infection, thus justifying their significance. The present study aimed to identify genetic subtypes described in the literature as more virulent and / or resistant to antifungal drugs, aiming at a better understanding of the population genetic structure of the *C. neoformans* complex in Brazil. For that, 64 clinical isolates (from 48 individuals) and 15 environmental isolates of *C. neoformans* (n = 79) were analyzed. STs were identified using the Multilocus Sequence Typing (MLST) scheme, proposed by ISHAM. The analyzed isolates were identified as: ST2 (n = 1), ST5 (n = 9), ST23 (n = 4), ST32 (n = 2), ST40 (n = 10), ST41 (n = 1), ST63 (n = 1), ST77 (n = 4), ST93 (n = 45) and ST232 (n = 2). Among the isolates, 72 were identified as sexual type MAT-alpha and 7 (all clinical) were identified as sexual type MAT-alpha/a. ST93, identified as the most prevalent in the studied population, is described in the literature as one of the most prevalent worldwide, in addition to being associated with high mortality in Uganda, higher mortality in Southeast Brazil and resistance to antifungal drugs amphotericin B and itraconazole. Regarding the other genotypes identified in the present study, it is described in the literature that: ST5 is one of the most virulent STs in Asia, ST32 is related to worse survival after one year of infection, ST40 apparently has high activity of the laccase enzyme and good survival in the CSF and type VNB (represented in this study by ST232) are more virulent, in addition to being related to higher mortality and rare isolation outside the African continent. In the present study, with the tools used it was possible to conclude that the population structure of the Brazilian strains of *C. neoformans* studied is highly clonal and without genetic

recombination. In addition, this is the first description of the identification of VNB strains in the state of Rio de Janeiro, and is also its first clinical isolation in Brazil. The identification of these potentially more virulent genotypes, more resistant to antifungal drugs and with a worse clinical prognosis justify the need to expand the clinical-epidemiological studies of cryptococcosis in Brazil and in the world, for the monitoring of circulating genotypes and consolidation of epidemiological surveillance in our country

**Keywords:** Cryptococcosis; *Cryptococcus neoformans*; Multilocus Sequence Typing; MLST; Molecular epidemiology.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AFLP</b>	Polimorfismo do comprimento de fragmento amplificado (amplified fragment length polymorphism)
<b>ATCC</b>	Registro na coleção americana de culturas (american type culture collection)
<b>BHI</b>	Agar infusão de cérebro e coração (brain heart infusion agar)
<b>CAP59</b>	Gene associado à cápsula mucopolissacarídica
<b>CC1</b>	Primeiro complexo clonal de VNI na árvore de abrangência mínima (minimum spanning tree)
<b>CC2</b>	Segundo complexo clonal de VNI na árvore de abrangência mínima (minimum spanning tree)
<b>CC3</b>	Terceiro complexo clonal de VNI na árvore de abrangência mínima (minimum spanning tree)
<b>CFP</b>	Coleção de fungos patogênicos
<b>CGB</b>	Agar canavanina-glicina-azul de bromotimol (canavanine-glycine-bromothymol blue agar)
<b>CrAg LFA</b>	Ensaio de fluxo lateral do antígeno criptocócico (cryptococcal antigen lateral flow assay)
<b>dATP</b>	Desoxiadenosina trifosfato (deoxyadenosine triphosphate)
<b>dCTP</b>	Desoxicitidina trifosfato (deoxycytidine triphosphate)
<b>dGTP</b>	Desoxiguanosano trifosfato (deoxyguanosine triphosphate)
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid)
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleotídeos (deoxyribonucleotides)
<b>dTTP</b>	Desoxitimidina trifosfato (deoxythymidine triphosphate)
<b>FCR</b>	Força centrífuga relativa
<b>Fiocruz</b>	Fundação Oswaldo Cruz
<b>GPD1</b>	Gene associado à gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
<b>GXM</b>	Glucuronoxilomanano
<b>GXMGal</b>	Glucuronoxilomanogalactano
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina e eosina
<b>HAART</b>	Terapia antirretroviral de alta eficácia (highly active antiretroviral therapy)
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana (human immunodeficiency virus)

<b>ID-YST</b>	Cartão do sistema VITEK 2 para a identificação de leveduras
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon-gama
<b>IGS</b>	Espaçador intergênico de sequências (intergenic spacer sequences)
<b>IGS1</b>	Espaçador intergênico do RNA ribossômico
<b>IL</b>	Interleucina
<b>INI</b>	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
<b>ISHAM</b>	Sociedade Internacional de Micologia Humana e Animal (International Society for Human and Animal Mycology)
<b>LAC1</b>	Gene associado a lacase
<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquidiano
<b>MALDI-TOF</b>	Espectrometria de massa com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo de voo (matrix assisted laser desorption-ionization - time of flight)
<b>MAT-a</b>	Tipo de acasalamento "a" (mating type a)
<b>MAT-alpha</b>	Tipo de acasalamento "alpha" (mating type alpha)
<b>MLMT</b>	Tipagem de múltiplos <i>loci</i> por microssatélites (multilocus microsatellite typing)
<b>MLST</b>	Tipagem por sequenciamento de múltiplos <i>loci</i> (multilocus sequence typing)
<b>NSA</b>	Agar semente de níger (niger seed agar)
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction)
<b>PDTIS</b>	Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
<b>PLB1</b>	Gene associado à fosfolipase B1
<b>RAPD</b>	Amplificação aleatória de DNA polimórfico (random amplified polymorphic DNA)
<b>RBC</b>	Rede Brasileira de Criptococose
<b>RFLP</b>	Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (restriction fragment length polymorphism)
<b>SDA</b>	Agar Sabouraud dextrose (Sabouraud dextrose Agar)
<b>SIRI</b>	Síndrome inflamatória da reconstituição imune
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SOD1</b>	Gene associado à cobre-zinco superóxido dismutase
<b>ST</b>	Subtipo molecular (sequence type)

<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa (tumor necrosis factor alpha)
<b>UFC</b>	Unidade formadora de colônia
<b>URA5</b>	Gene associado à orotidina-monofosfato pirofosforilase
<b>YPD</b>	Agar extrato de levedura-peptona-dextrose (yeast extract-peptone-dextrose agar)

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Células de *Cryptococcus neoformans* recuperadas após infecção pulmonar em camundongos, observadas em microscopia óptica pela preparação com tinta da China, evidenciando células capsuladas e com brotamento. Barra de escala de 100 µm.....21
- Figura 2** - Aspecto macroscópico do cultivo dos agentes da criptococose nos meios agar semente de níger (a) e agar canavanina-glicina-azul de bromotimol (b), sendo este último, da esquerda para a direita: CGB negativo (*C. neoformans*), CGB indeterminado e CGB positivo (*C. gattii*).....34
- Quadro 1** - Concordância entre os diferentes métodos utilizados para a tipagem molecular do complexo *Cryptococcus neoformans*.....45
- Quadro 2** - Concordância entre os diferentes métodos utilizados para a tipagem molecular do complexo *Cryptococcus gattii*.....45
- Quadro 3** - Descrição dos sete *loci* genéticos utilizados no esquema MLST para a genotipagem dos complexos de espécies *Cryptococcus* sp.....46
- Figura 3** – Mapa representativo das regiões e estados brasileiros de acordo com as cepas do complexo de espécies *C. neoformans* utilizadas no estudo, evidenciando o número de cepas (n), a natureza do isolamento clínico ou ambiental (na cor azul e verde, respectivamente) e o material de isolamento.....50
- Tabela 1** - Lista das cepas analisadas no estudo, seu estado de origem (UF), a natureza do seu isolamento (clínico ou ambiental), o tipo de material de isolamento e seus respectivos resultados de identificação molecular (tipo sexual, tipo molecular principal e subtipo molecular).....56
- Figura 4** - Árvore filogenética pelo algoritmo *Neighbor-Joining*, software Sequencher 4.9, feita com as sequências combinadas dos genes *CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5* e a região IGS1 (sete *loci*) de 25 STs, sendo 10 STs do presente estudo (▲) mais 15 STs previamente publicados. Estão incluídos como dados de identificação: país de origem (código de países ISO 3166-1 alpha-3); Unidade Federativa e número de cepas entre parênteses (apenas para os STs do presente estudo); e citação bibliográfica. O número sobre os ramos são valores de suporte (*bootstrap*), obtidos a partir de 1000 pseudo-repetições. Podem ser observados quatro agrupamentos principais: VNI C1, VNB, VNI C2 e VNII.....59
- Figura 5** - Árvore de abrangência mínima (*Minimum Spanning Tree*) pelo algoritmo *goeBURST*, software PHYLOViZ, feita com os dez STs identificados no presente estudo, representando a distribuição de acordo com a região brasileira de origem (A) e com o tipo de isolamento, clínico ou ambiental (B). Os números no centro de cada círculo identificam o ST e as subdivisões indicam a porcentagem de cepas por categoria de interesse (região de origem ou tipo de isolamento), representadas por uma cor específica. Podem ser observados três grupos principais, relacionados aos tipos moleculares VNI, VNII e VNB.....61

**Figura 6** - Árvore de abrangência mínima (*Minimum Spanning Tree*) pelo algoritmo *goeBURST*, software PHYLOViZ, feita com os STs identificados no presente estudo (indicados por asterisco) somados aos dados previamente publicados em todo o mundo, representando a diversidade observada nos isolados globais e sua distribuição de acordo com o continente de origem. Os números no centro de cada círculo identificam o ST e as subdivisões indicam a porcentagem de cepas por continente, representados por uma cor específica. Podem ser observados três grupos principais, relacionados aos tipos moleculares VNI, VNII e VNB, além dos subgrupos CC1, CC2 e CC3 do tipo molecular VNI.....62

**Figura 7** – Segmentos da árvore de abrangência mínima (*Minimum Spanning Tree*) pelo algoritmo *goeBURST*, software PHYLOViZ, destacando os grupos relacionados aos tipos moleculares VNII e VNB. Os STs identificados no presente estudo estão indicados por asterisco. No grupo do tipo molecular VNB estão o genótipo ST232, identificado no presente estudo, e os genótipos ST504 e ST527, anteriormente descritos na literatura como os primeiros isolados brasileiros de VNB.....63

**Figura 8** – Segmento da árvore de abrangência mínima (*Minimum Spanning Tree*) pelo algoritmo *goeBURST*, software PHYLOViZ, destacando os subgrupos CC2, composto por STs predominantemente asiáticos e africanos, e CC3, onde os STs não apresentam predomínio de um continente específico. Os STs identificados no presente estudo estão indicados por asterisco.....64

**Tabela 2** - Análise das diversidades haplotípica ( $H_d$ ) e nucleotídica ( $\pi$ ), pelo software DnaSP v5.10.1, dos 79 isolados de *Cryptococcus neoformans*.....65

## 21 SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>1.1 A criptococose – um breve histórico .....</b>	<b>17</b>
<b>1.2 Os complexos <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i>.....</b>	<b>20</b>
1.2.1 Aspectos evolutivos.....	22
1.2.2 Fatores de virulência .....	23
1.2.3 Eco-epidemiologia.....	25
1.2.4 Manifestações clínicas .....	29
1.2.5 Diagnóstico laboratorial.....	31
1.2.6 Tratamento.....	39
<b>1.3 Identificação molecular dos complexos <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>.....</b>	<b>44</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>48</b>
2.1 Objetivo geral .....	48
2.2 Objetivos específicos .....	48
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>49</b>
3.1 Amostragem, seleção e recuperação das cepas .....	49
3.2 Extração de ácidos nucleicos.....	51
3.3 Determinação do tipo sexual .....	51
3.4 Sequenciamento e comparação com o banco de dados de MLST.....	52
3.5 Análise dos dados .....	53
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>75</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>76</b>



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 A criptococose – um breve histórico

A criptococose é uma infecção fúngica causada pelos complexos de espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus*. Nos últimos anos, foi possível perceber um aumento significativo do interesse em relação ao estudo da biologia e identificação dos agentes da criptococose, bem como sobre a compreensão de sua interação com os hospedeiros, perfil de susceptibilidade aos fármacos antifúngicos, fatores de virulência, epidemiologia clínica, ecologia e genética populacional desta importante micose sistêmica (FIRACATIVE *et al.*, 2018).

*Cryptococcus neoformans* foi isolado pela primeira vez na Itália, em 1894, por Francesco Sanfelice. Enquanto estudava microrganismos por ele chamados de “blastomicetos”, Sanfelice isolou um microrganismo semelhante a uma levedura encapsulada a partir do suco de frutas, e o nomeou *Saccharomyces neoformans* (SANFELICE, 1894) considerando erroneamente que se tratava da identificação de um novo microrganismo pertencente a *Saccharomyces* sp.

No mesmo ano, o patologista alemão Otto Busse isolou um microrganismo, semelhante ao isolado por Sanfelice, a partir de uma lesão com características de um sarcoma localizado na tíbia de uma jovem paciente. Ao descrever o caso, Busse identificou o microrganismo como *Saccharomyces* sp., e nomeou a doença como “saccharomycosis hominis”, tendo por tradução, “sacromicose humana”. A descrição de Busse foi a primeira descrição da criptococose em um paciente humano vivo (BUSSE, 1894, 1895).

Em 1896, um caso humano de óbito por infecção desta levedura no sistema nervoso central (SNC) foi relatado pelo patologista francês Ferdinand Curtis, que a identificou como *Megalococcus myxoides*. Posteriormente, experimentos com animais em laboratório evidenciaram lesões granulomatosas semelhantes a tumores, o que levou a levedura a ser nomeada *Saccharomyces subcutaneous tumefaciens* (CURTIS, 1896). Em 1901, foi provada a ausência de ascósporos nestas leveduras (estruturas características e obrigatórias em *Saccharomyces* sp.), e por este motivo, Jean-Paul Vuillemin alterou mais uma vez o nome do organismo isolado para *Cryptococcus hominis* (VUILLEMIN, 1901).

No ano de 1916, a formação de regiões claras como halos ao redor das células de leveduras em cortes histopatológicos de meninges induziu os pesquisadores Stoddard e Cuttler ao erro, por confundir a cápsula com o efeito semelhante à lise tecidual, o que mais uma vez proporcionou a troca de nome para *Torula histolytica*, (STODDARD; CUTLER, 1916).

Na década de 1940, o Dr. Carlos da Silva Lacaz, importante médico e pesquisador da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, participou do relato dos dois primeiros casos brasileiros da doença, o primeiro em 1941 na cidade de São José do Rio Preto - SP (ALMEIDA; LACAZ, 1941), e o segundo em 1944 (ALMEIDA; LACAZ; SALLES, 1944), obtendo o primeiro isolamento clínico de paciente humano no Brasil (PAPPALARDO; MELHEM, 2003).

Em 1950, os estudos de Benham demonstraram que todos os isolados clínicos de infecções humanas pertenciam a uma única espécie, com duas variedades sorológicas, o que motivou a substituições dos termos "torulose/torula meningite" por criptococose. Esta alteração simultaneamente refletiu na permanência do nome da levedura em *Cryptococcus neoformans*, como *nomen conservandum*, tanto para isolados ambientais como para clínicos, pondo fim à discussão sobre sua terminologia (BENHAM, 1950).

*C. neoformans* foi considerado uma espécie homogênea até 1949, quando a existência de sorotipos foi revelada com base nas propriedades antigênicas de sua cápsula mucopolissacarídica. A heterogeneidade dos antígenos criptocócicos foi confirmada por Evans, que identificou os sorotipos A, B e C (EVANS, 1950; EVANS; KESSEL, 1951). Apenas em 1968, Wilson e col. identificaram um quarto sorotipo (sorotipo D) (WILSON; BENNETT; BAILEY, 1968).

No período de transição entre as décadas de 1950 e 1960, avanços significativos aconteceram no diagnóstico laboratorial da criptococose. Seeliger e Staib descobriram que as atividades das enzimas urease e fenol-oxidase, esta última que atua na produção de melanina, poderiam diferenciar este microrganismo de outras leveduras, assim como a presença de cápsula (SEELIGER, 1956; STAIB, 1962). Apesar de *C. neoformans* ter sido identificado pela primeira vez como um patógeno humano no final do século XIX, não era reconhecido como uma causa comum de doença em humanos até o final da década de 1970 (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

Até a década de 1970, a criptococose era considerada uma doença rara, uma vez que se tratava de uma infecção majoritariamente oportunista. A incidência da doença começou a aumentar a partir do estabelecimento dos esquemas de terapia imunossupressora, ainda na década de 1970. Mais tarde, na década de 1980, se iniciou um aumento exponencial do número de casos, atingindo índices sem precedentes, causado pelo surgimento da comorbidade que logo se tornaria o principal fator predisponente para a criptococose, a epidemia de HIV/aids (KWON-CHUNG *et al.*, 2014).

Em 1999, a região do Noroeste Pacífico da América do Norte, principalmente a Ilha de Vancouver no Canadá, viveu uma importante epidemia de criptococose por *C. gattii*, espécie de isolamento anteriormente desconhecida na região, e teoricamente restrita aos climas tropical e subtropical (DATTA; BARTLETT; MARR, 2009). Mais de 200 casos de infecção por *C. gattii* foram documentados em humanos e mais de 400 em animais, dentre estes: gatos, cães, golfinhos, pássaros, furões, lhamas, cavalos etc, representando uma incidência anual de 6,5 casos por milhão na Colúmbia Britânica e 27,9 casos por milhão na Ilha de Vancouver, sendo a mais alta incidência relatada em todo o mundo, com uma taxa de letalidade estimada em 4,5% entre os anos 1999 e 2006 (MACDOUGALL *et al.*, 2007).

Após todos estes acontecimentos, a comunidade científica dedicada ao estudo da criptococose expandiu-se rapidamente, formando redes de pesquisadores e instituições internacionais que proporcionaram as condições para o desenvolvimento de uma ampla lista de metodologias e técnicas moleculares utilizadas para uma melhor compreensão acerca da criptococose (KWON-CHUNG *et al.*, 2014).

Entre os anos de 2011 e 2013, foi criada a Rede Brasileira de Criptococose (RBC), integrada por 32 grupos interdisciplinares de pesquisa de diversas universidades, institutos, hospitais e laboratórios de saúde pública no Brasil, que se propõe a estudar a epidemiologia, marcadores moleculares e dados clínicos de casos brasileiros de criptococose, reconhecendo fatores de risco e identificando variações na virulência de cepas deste fungo. A escassez dos estudos epidemiológicos brasileiros acerca da criptococose e o seu diagnóstico drasticamente tardio serviram de motivação para a criação desta rede (FERREIRA-PAIM *et al.*, 2017). Ao todo, 21 dos 26 estados brasileiros a compõe, e dentre eles estão: Bahia, Ceará, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraná, Piauí, Rio de Janeiro, Roraima, Santa Catarina e São Paulo, além da capital Brasília – Distrito Federal.

## 1.2 Os complexos *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*

O gênero *Cryptococcus* faz parte da Família *Tremellaceae*, pertencente ao Filo *Basidiomycota*, sendo este o seu estado anamórfico, de reprodução assexuada. A descoberta das duas formas sexuadas distintas (anteriormente classificadas como *Filobasidiella neoformans* e *Filobasidiella bacillispora*) é considerada a base para definir o que conhecemos hoje como duas espécies distintas, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, anteriormente conhecidas como *C. neoformans* variedade *neoformans* e *C. neoformans* variedade *gattii* respectivamente (KWON-CHUNG *et al.*, 2014).

De acordo com Kwon-Chung e col. (2017), as espécies causadoras de criptococose estão divididas em dois complexos principais: o complexo de espécies *C. neoformans* e o complexo de espécies *C. gattii*. Esta nomenclatura foi proposta para indicar que ambas as espécies contêm linhagens geneticamente diversas, sendo propostas como uma classificação provisória (KWON-CHUNG *et al.*, 2017).

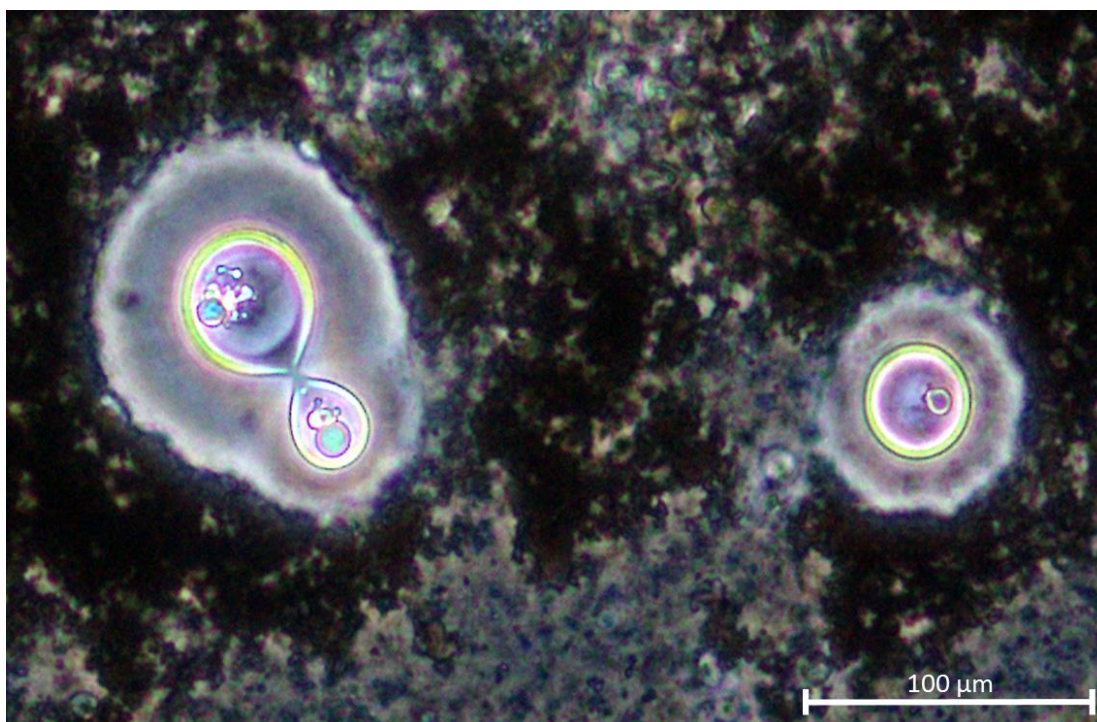
Todavia, uma nova taxonomia sugerida por Hagen e col. (2015, 2017) propõe o reconhecimento de duas espécies incluídas no complexo *C. neoformans* (*C. neoformans* e *C. deneoformans*), excluídos os híbridos diploides e aneuplóides, e de cinco espécies no complexo *C. gattii* (*C. gattii*; *C. deuterogattii*, *C. bacillisporus*, *C. tetragattii* e *C. decagattii*).

Embora esta classificação recentemente proposta tenha o mérito para o progresso na taxonomia destes patógenos dentro do gênero *Cryptococcus*, tal proposta taxonômica não é totalmente aceita pela comunidade científica internacional, que a considera prematura, inclusive por terem sido encontradas algumas dificuldades reveladas por estudos moleculares mais recentes (COGLIATI *et al.*, 2019; KWON-CHUNG *et al.*, 2017).

Os complexos *C. neoformans* e *C. gattii* apresentam-se como leveduras de forma esférica ou oval, medindo geralmente de 2 a 8 µm de diâmetro (podendo chegar a 20 µm), com brotamento único ou múltiplo (Figura 1), e têm como principais características a presença de cápsula mucopolissacarídica de espessura variada, ausência de capacidade fermentativa, produção da enzima urease e produção de melanina dependente do substrato em que se desenvolve. A cultura de *Cryptococcus* spp. *in vitro* apresenta, em geral, colônias de cor branca a creme, com margem lisa e inteira, textura mucoide e brilhante, geralmente após três dias de incubação à

temperatura de 25 a 37 °C em cultivo nos meios de rotina em micologia não acrescidos de antifúngicos (ex.: cicloheximida) (SIDRIM; ROCHA, 2004; MORETTI *et al.*, 2008).

Figura 1 - Células de *Cryptococcus neoformans* recuperadas após infecção pulmonar em camundongos, observadas em microscopia óptica pela preparação com tinta da China, evidenciando células capsuladas e com brotamento. Barra de escala de 100 µm.



Fonte: Imagem gentilmente cedida pelo Dr. Fábio Brito-Santos (INI/Fiocruz).

*C. neoformans* e *C. gattii* podem ser diferenciadas através de características fenotípicas, dentre elas, a morfologia celular (nas formas sexuadas e assexuadas), características fisiológicas e sorotipagem. Para *C. neoformans* a célula da levedura ao microscópio óptico é quase sempre uniformemente redonda (globosa), enquanto as leveduras de *C. gattii* são uma mistura de células redondas e ovaladas (globosas e elípticas, respectivamente). A morfologia das suas fases sexuadas também apresenta diferenças, como a produção de basidiósporos ovalados (elípticos) pelo teleomorfo de *C. neoformans*, e basidiósporos em formato de bastão (ou bacilos), com paredes lisas, pelo teleomorfo de *C. gattii* (KWON-CHUNG, 1975). As diferenças no metabolismo, principalmente na assimilação de nitrogênio e a resistência ao aminoácido canavanina, permitem a diferenciação pelo cultivo em agar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) (KWON-CHUNG; POLACHECK; BENNETT, 1982).

A caracterização de sorotipos através de antígenos capsulares permite a classificação de três grupos para a espécie *C. neoformans* e dois para *C. gattii*. Em *C. neoformans* var. *grubii* é definido o sorotipo A, e em *C. neoformans* var. *neoformans*, os sorotipos D e AD (híbrido entre A e D). Para *C. gattii*, caracterizam-se os sorotipos B e C (KWON-CHUNG *et al.*, 2014). O sorotipo A surgiu como uma variedade da espécie *C. neoformans* (*C. neoformans* var. *grubii*) a partir das análises moleculares de sequências do gene *URA5*, juntamente com padrões da técnica de *DNA-fingerprinting*, que demonstram diferenças genéticas importantes entre este sorotipo e o sorotipo D, atualmente *C. neoformans* var. *neoformans* (FRANZOT; SALKIN; CASADEVALL, 1999). Apesar de ter sido bastante utilizado no passado para estudos epidemiológicos, os kits de sorotipagem não são mais produzidos comercialmente e, os estudos epidemiológicos e de genotipagem são realizados atualmente com técnicas de biologia molecular.

### 1.2.1 Aspectos evolutivos

*C. neoformans* e *C. gattii* provavelmente divergiram de um ancestral comum de comportamento saprófita, há aproximadamente 30 a 40 milhões de anos (FINDLEY *et al.*, 2009; XU; VILGALYS; MITCHELL, 2000). No que se refere a *C. neoformans*, estudos genéticos extensos indicam que sua origem seja a África Subsaariana (LITVINTSEVA *et al.*, 2007; LITVINTSEVA; MITCHELL, 2012). A clonalidade observada na maioria das cepas de *C. neoformans* fora do continente africano apoia a teoria de que populações africanas recombinantes ocasionalmente se dispersaram pelo mundo, sobretudo nos últimos cinco mil anos, com potencial participação de migrações humanas e/ou aviárias nestes eventos (LITVINTSEVA *et al.*, 2011).

Em relação a *C. gattii*, existe um consenso de que a Austrália e a América do Sul sejam suas origens evolutivas, estimada como tendo ocorrido há 50 mil anos. Esse modelo se deve à clonalidade da maioria dos indivíduos dispersos e a formação de clusters destes indivíduos quando comparados a cepas australianas e sul-americanas nas análises filogenéticas (BILLMYRE *et al.*, 2014; ENGELTHALER *et al.*, 2014; HAGEN *et al.*, 2013).

Os complexos de espécies possuem um sistema de acasalamento bipolar (*bipolar mating*) entre células dos tipos de acasalamento “a” (MAT-a) e “alpha” (MAT-alpha). Neste sistema podem ser observados tanto o acasalamento entre os tipos

sexuais diferentes - MAT-a e MAT-alpha, com a divisão mendeliana dos alelos (acasalamento clássico) - quanto entre linhagens do mesmo tipo sexual – entre MAT-a e MAT-a ou MAT-alpha e MAT-alpha (FRASER *et al.*, 2005; LIN; HULL; HEITMAN, 2005). Como resultado deste processo, podem ser originadas cepas diplóides, aneuplóides e híbridos inter e intraespécies, isolados tanto de amostras ambientais quanto de amostras clínicas (BOVERS *et al.*, 2006; LIN *et al.*, 2007, 2009; NI *et al.*, 2013). Desta forma, estes organismos compõem uma estrutura populacional complexa, com recombinação, aneuploidia e etapas de distribuição clonal durante eventos de dispersão globais (MAY *et al.*, 2016).

### 1.2.2 Fatores de virulência

*Cryptococcus* spp. apresentam um grupo bem específico de fatores de virulência, características que permitem sua sobreposição às defesas imunológicas de um hospedeiro, dentre eles: termotolerância (capacidade de crescimento a 37 °C), presença de cápsula mucopolissacarídica, produção de enzimas (ex.: urease, fosfolipases, proteinases e superóxido dismutases), produção de melanina (parede celular) e sistema de acasalamento bipolar (*bipolar mating*), além da secreção de vesículas extracelulares carreadoras de alguns destes fatores de virulência (KWON-CHUNG *et al.*, 2014).

A termotolerância é fundamental para a patogenicidade de *Cryptococcus* spp., já que indica a possibilidade de crescimento em tecidos de mamíferos. A principal razão que justifica o fato de ambos, *C. neoformans* e *C. gattii*, serem os mais importantes agentes patogênicos entre mais de 70 espécies do gênero *Cryptococcus* é a sua capacidade de tolerância à temperatura humana fisiológica (FONSECA *et al.*, 2009).

Um dos primeiros fatores de virulência a ser descrito em leveduras do gênero *Cryptococcus* foi a presença de uma cápsula mucopolissacarídica ancorada a parede celular (BULMER; SANS, 1967; BULMER; SANS; GUNN, 1967), composta basicamente por glucanos, quitina, quitosana, e glicoproteínas, podendo incluir também manoproteínas e os ácidos hialurônico e siálico. Dois grandes polissacarídeos compõem majoritariamente a cápsula de *Cryptococcus* spp., glucuronoxilomanano (GXM) e glucuronoxilomanogalactano (GXMGal), de um a sete milhões de Da e 100 mil Da respectivamente, relacionados diretamente a virulência

(KWON-CHUNG *et al.*, 2014). A cápsula pode propiciar a resistência à fagocitose mediada por células do sistema fagocítico mononuclear e polimorfonucleares, o que interfere diretamente na resposta imunológica do hospedeiro (KWON-CHUNG *et al.*, 2014). Cepas de *Cryptococcus* spp. mutantes acapsuladas têm menor virulência *in vivo* em modelos murinos quando comparadas com cepas que apresentam cápsula, o que reforça a importância da cápsula como fator de virulência (VECCHIARELLI *et al.*, 1995). Uma considerável variação fenotípica é exibida durante a infecção, incluindo aumento do tamanho da cápsula, liberação de fragmentos capsulares (secreção direta de exopolissacarídeos e de vesículas carreadoras), células gigantes ( $\geq 15 \mu\text{m}$ ) e micro células ( $\leq 1 \mu\text{m}$ ) (FERNANDES *et al.*, 2018).

Em *Cryptococcus* spp. as enzimas de degradação são responsáveis pela sobrevivência no interior das células do hospedeiro, penetração nos tecidos, modulação da resposta imunológica e disseminação para o SNC (KWON-CHUNG *et al.*, 2014). Dentre as enzimas produzidas por *Cryptococcus* spp. está a urease, catalisadora da hidrólise de uréia em amônia e carbamato, que gera o aumento do pH fisiológico (alcalinização). A hipótese mais aceita é a de que o principal papel dessa enzima para *Cryptococcus* spp. seja converter a ureia que não pode ser assimilada em uma fonte utilizável de nitrogênio para o metabolismo celular deste fungo. Esta enzima também tem sido descrita como sendo uma importante ferramenta para a propagação de leveduras no pulmão, já que parece promover o acúmulo de células dendríticas imaturas (OSTERHOLZER *et al.*, 2009). As fosfolipases são capazes de digerir a membrana celular e provocar a lise, além de decompor o surfactante produzido nos pulmões, facilitando a infecção neste sítio. As proteinases, além de degradarem os tecidos, são capazes de destruir proteínas que fazem parte do sistema imune, como imunoglobulinas e componentes do sistema complemento (CAMPOS; BARONI, 2010).

A enzima fenol-oxidase é capaz de produzir melanina, substância frequentemente associada à virulência de fungos (LANGFELDER *et al.*, 2003). A oxidação enzimática de compostos fenólicos presentes nos substratos assimilados por *Cryptococcus* spp. pode induzir a produção de pigmentos castanho-escuros, do tipo melanina, que protegem as células da levedura de possíveis danos causados pelo ambiente. A melanina pode, por exemplo, proteger o fungo em parasitismo dos radicais livres tóxicos que são produzidos pelo sistema imune do hospedeiro, enquanto que na natureza pode proteger contra a radiação ultravioleta dos raios



solares, as variações de temperatura, a toxicidade com metais pesados, além de promover resistência ao estresse oxidativo (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2006). Alguns neurotransmissores, como as catecolaminas dopamina e adrenalina, são importantes substratos para a síntese de melanina, o que serve de teoria para explicar o tropismo de *Cryptococcus* spp. pelo SNC (WANG; CASADEVALL, 1994).

A reprodução sexuada está ligada à virulência em *Cryptococcus* spp., através da produção de basidiósporos infectantes e pela produção de células gigantes, frequentemente encontradas nos pulmões do hospedeiro. Além disso, pode promover o surgimento de linhagens que podem ser mais suscetíveis a evasão do sistema imune, latência ou disseminação. Ao que tudo indica, basidiósporos podem ser diretamente fagocitados por macrófagos alveolares, ao contrário das leveduras que geralmente são fagocitadas via opsonização (HEITMAN *et al.*, 2014).

### 1.2.3 Eco-epidemiologia

*C. neoformans* é cosmopolita, se desenvolvendo em climas e substratos diversos. Desde a primeira descrição de sua fonte ambiental feita por Emmons no início da década de 1950 (EMMONS, 1951; 1955 apud KWON-CHUNG *et al.*, 2014, p. 2), *C. neoformans* vem sendo frequentemente isolado de excrementos de pombos, ricos em fontes de nitrogênio, como uréia e creatinina. Entretanto, o habitat de diferentes espécies de aves, sobretudo aves gregárias em cativeiro, também podem se apresentar contaminadas (PASSONI *et al.*, 1998).

Porém, ao contrário do que se imaginava, aves raramente estão infectadas, visto que sua temperatura corporal (aproximadamente 42 °C) é superior à termotolerância para o crescimento de *Cryptococcus* spp., sugerindo que o isolamento destes organismos dos bicos, patas e penas se dá pela contaminação através de alimentos ingeridos ou pelas próprias excretas contaminadas que se encontram no ambiente (KWON-CHUNG *et al.*, 2014). A associação de *C. neoformans* com pombos selvagens pode ser considerada uma importante fonte de infecção em áreas urbanas densamente povoadas (ANZAI *et al.*, 2014; KHAN *et al.*, 1978; LITTMAN; BOROK, 1968; MAY *et al.*, 2016; MORETTI *et al.*, 2008).

Após o primeiro isolamento de *C. gattii* de resíduos de árvores da espécie *Eucalyptus camaldulensis* (ELLIS; PFEIFFER, 1990), acreditava-se que o habitat natural desta espécie seria distinto da espécie *C. neoformans*, até que ocos em

troncos de árvores de várias espécies foram identificados como nicho primário de ambos os complexos de espécies *C. neoformans* e *C. gattii* (LAZÉRA *et al.*, 2000; ANZAI *et al.*, 2014). Atualmente, a casca, ocos em troncos e a madeira em decomposição de mais de 36 gêneros de árvores têm sido descritos como fonte de *Cryptococcus* spp. (LAZÉRA *et al.*, 2011).

Tanto *C. neoformans* quanto *C. gattii* têm sido isolados de poeira domiciliar, sobretudo onde há presença de aves em cativeiro, seja no interior das casas ou no peridomicílio, e em construções de madeira, sendo esta uma importante fonte de infecção (BRITO-SANTOS *et al.*, 2015; PASSONI *et al.*, 1998).

Recentemente, Samarasinghe e col. (2019) descreveram o isolamento inédito de *C. neoformans* (VNIV) em amostras de solo da Arábia Saudita, Oriente Médio, em clima desértico (caracterizado pela alta temperatura, baixa umidade e vegetação escassa), representando a descoberta de um nicho ecológico até então inexplorado, ou ainda, uma possível expansão desta espécie para um novo nicho.

*C. gattii* é descrito como prevalente em regiões de clima tropical/subtropical, embora o seu isolamento em surtos ocorridos em países de clima temperado demonstra a sua capacidade de adaptação a novos ambientes (BYRNES *et al.*, 2009; HAGEN *et al.*, 2012b; KIDD *et al.*, 2004). Desta forma, áreas de clima temperado e frio devem ser incluídas em sua distribuição geográfica (FRANZOT; SALKIN; CASADEVALL, 1999). Durante a epidemia humana de criptococose ocorrida no Canadá a partir de 1999, *C. gattii* foi, também, isolado a partir de amostras ambientais como solo, ar, água e outras espécies de árvores além de *E. camaldulensis* (GALANIS *et al.*, 2010; KIDD *et al.*, 2004; SPRINGER; CHATURVEDI, 2010).

Considera-se que as leveduras e basidiósporos dos complexos *C. neoformans* e *C. gattii* sejam as partículas infectantes da criptococose, visto que a inalação destas estruturas desseccadas no ambiente é a principal via de infecção da doença (MORETTI *et al.*, 2008), exceto em raros casos de iatrogenia (BADDLEY *et al.*, 2011) ou eventos de transmissão zoonótica (LAGROU *et al.*, 2005). Os propágulos inalados colonizam o trato respiratório e se instalam nos alvéolos pulmonares, onde, na maioria das vezes, não causam sinais e sintomas, sendo assim uma forma latente da infecção. Fatores como o estado imunológico do hospedeiro, a espécie causadora da infecção, a virulência do isolado e o número de propágulos inalados, podem ser determinantes para definir uma infecção assintomática (que pode evoluir espontaneamente para a cura) ou disseminação hematogênica com posterior acometimento sistêmico,

principalmente no sistema nervoso central (SNC) nas formas de meningite, encefalite ou meningoencefalite (KWON-CHUNG *et al.*, 2014).

Enquanto a infecção por *C. neoformans* parece predominante em hospedeiros imunocomprometidos (em especial, indivíduos que vivem com HIV/aids) e tem como principal manifestação clínica a meningoencefalite, *C. gattii* acomete geralmente indivíduos imunocompetentes e costuma apresentar um importante envolvimento pulmonar, desenvolvimento de lesões mais extensas e sequelas neurológicas mais graves, além de ter uma resposta mais demorada em relação a terapia com fármacos antifúngicos, o que proporciona um pior prognóstico em relação às infecções por *C. neoformans* (MORETTI *et al.*, 2008). A criptococose por *C. gattii* ocorre na América Latina em geral (dentre os países estão Argentina, Brasil, Colômbia, México, Peru e Venezuela), algumas regiões dos Estados Unidos e Canadá, países da África Central, países do sudeste da Ásia, Austrália e Papua-Nova Guiné (BYRNES *et al.*, 2009; HAGEN *et al.*, 2012a; KIDD *et al.*, 2004; MORETTI *et al.*, 2008).

A maioria dos casos de criptococose está relacionada a indivíduos vivendo com HIV/aids, e frequentemente este diagnóstico é feito simultaneamente com o diagnóstico da criptococose. Pode-se ainda deduzir que a criptococose funciona como “sinalização” para a suspeita de HIV/aids (MEYA *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2009; SABIITI; MAY, 2012). Embora a taxa anual da doença tenha diminuído após a disseminação do uso da terapia antirretroviral de alta eficácia - highly active antiretroviral therapy - (HAART) nos países desenvolvidos, a prevalência de infecção permanece alta em países de baixa e média renda, apesar da disponibilidade de HAART. Além disso, a criptococose é responsável por 15% de todas as mortes relacionadas à HIV/aids no mundo (MAY *et al.*, 2016; PARK *et al.*, 2009; TENFORDE *et al.*, 2017).

Em 2014, estima-se que tenham ocorridos 223 mil casos de meningite criptocócica em pessoas vivendo com HIV/aids no mundo, resultando em mais de 180 mil mortes (75% das mortes apenas na África Subsaariana). Do total de casos, 162.5 mil na África Subsaariana, 43.2 mil na Ásia-Pacífico, 5.3 mil na América Latina, 4.4 mil na Europa, 3.3 mil no norte da África e no Oriente Médio, três mil na América do Norte e 1.4 mil no Caribe. Na América Latina, que ocupa a terceira posição em número de casos relatados, Brasil e Colômbia foram os países com maior incidência de casos de criptococose, com mil a 2.5 mil casos, seguidos por Argentina e México, com uma incidência de 0.5 mil a mil casos (RAJASINGHAM *et al.*, 2017).

Estima-se que, por ano, existam cerca de um milhão de casos de meningite criptocócica em todo o mundo, sendo 80% desses casos no continente africano. Na África Subsaariana a criptococose é a causa mais comum de meningite em pessoas com HIV/aids (MAY *et al.*, 2016; RAJASINGHAM *et al.*, 2017). A letalidade da meningite criptocócica após um ano de infecção varia de 10% a 30% na América do Norte, e pode chegar a 50% a 100% em países em desenvolvimento (RAJASINGHAM *et al.*, 2017; WILLIAMSON *et al.*, 2017).

Além do grande impacto sobre os indivíduos que vivem com HIV/aids, a criptococose ocupa a terceira posição como infecção fúngica que mais acomete indivíduos transplantados, visto que indivíduos submetidos à terapia imunossupressora ou quimioterápica apresentam grande risco de contrair a infecção (SINGH *et al.*, 2009). Estima-se que apenas nos Estados Unidos, no ano de 2016, mais de 33 mil transplantes de órgãos tenham sido realizados, apresentando como importante complicação um número inaceitavelmente alto de casos de infecção criptocócica, onde aproximadamente 2% a 3% dos receptores de órgãos sólidos desenvolvem infecção criptocócica na sua forma disseminada (MOURAD; PERFECT, 2018).

No México, dentre as espécies causadoras de fungemia em pacientes humanos com diferentes tipos de imunodeficiências, *C. neoformans* teve uma prevalência de 21%, atrás apenas de *Histoplasma capsulatum* (GAONA-FLORES *et al.*, 2016). Além disso, a criptococose foi a terceira infecção fúngica invasiva mais comum (13%) encontrada em um hospital altamente especializado, após candidíase e mucormicose (MÉNDEZ-TOVAR *et al.*, 2016).

Em Cuba, dentre as infecções oportunistas que afetam o SNC em indivíduos vivendo com HIV/aids, a criptococose é a segunda mais comum (CASTILLO, 2014). Na Venezuela, um estudo realizado em um centro de referência nacional constatou que a criptococose é a terceira micose invasiva mais prevalente, com uma prevalência de 19%, após histoplasmose e paracoccidiodomicose. Entretanto, na população com HIV/aids, *C. neoformans* foi isolado de 27% dos casos (REVIÁKINA *et al.*, 2007). Na Argentina, a criptococose é a segunda infecção fúngica sistêmica mais frequente, com uma prevalência de 20% (DAVEL; CANTEROS, 2007).

Na Colômbia, a incidência média anual de criptococose na população geral foi estimada em 2,4 casos por 100 habitantes, enquanto na população infectada pelo HIV este valor foi estimado em três a 3,3 casos por 100 habitantes (LIZARAZO *et al.*, 2007;

VÉLEZ; ESCANDÓN, 2016). Castro-Jiménez e col. (2011) relataram a criptococose como a micose oportunista mais comum em pessoas vivendo com HIV/aids na Colômbia, com uma prevalência de 76%.

No Brasil, a criptococose é a primeira manifestação de doença oportunista em mais de 4% dos indivíduos vivendo com HIV/aids (MORETTI *et al.*, 2008). A doença causada por *C. neoformans* é prevalente em todas as regiões do país, enquanto a infecção por *C. gattii* se distribui predominantemente nas regiões Norte e Nordeste, com ocorrência menor na região Centro-Oeste e casos esporádicos nas regiões Sul e Sudeste (BRITO-SANTOS *et al.*, 2015; MORA *et al.*, 2010; PINTO JUNIOR *et al.*, 2010; SEVERO *et al.*, 2009; TRILLES *et al.*, 2008). No estado do Rio de Janeiro, de 1994 a 2004, foram observados 696 casos de meningite criptocócica, com uma incidência média de 0,45 por 100.000 habitantes, onde HIV/aids foi relatada em 61,2% dos casos e, em 51,8% dos casos, a infecção provocou a morte (LEIMANN; KOIFMAN, 2008).

#### 1.2.4 Manifestações clínicas

As apresentações clínicas da criptococose podem variar desde manifestações localizadas até a disseminação (MORETTI *et al.*, 2008). *C. neoformans* e *C. gattii* têm predileção por causar lesões nos pulmões e no SNC. No Brasil, a doença mais comum após a disseminação é a meningite ou meningoencefalite, e a pneumonia é a segunda apresentação mais frequente após o acometimento do SNC. Todavia, deve-se enfatizar que estes agentes podem se disseminar e infectar a maioria dos órgãos em indivíduos gravemente imunossuprimidos, apresentando capacidade de parasitar qualquer sítio do corpo humano, como a pele, olhos, miocárdio, articulações, próstata, medula óssea, vasos linfáticos, linfonodos e o trato urinário (BICANIC; HARRISON, 2004; MAZIARZ; PERFECT, 2016).

Existem raríssimos relatos de infecção pelas espécies *Cryptococcus laurentii*, *C. curvatus* e *C. albidus* em humanos, entretanto, somente *C. neoformans* e *C. gattii* são consideradas as espécies causadoras da criptococose (BERNAL-MARTINEZ *et al.*, 2010).

### Infecção no sistema respiratório (criptococose pulmonar)

As manifestações clínicas da criptococose pulmonar variam desde uma colonização subclínica das vias aéreas, formação de nódulos pulmonares simples e até uma grave pneumonia, com síndrome respiratória aguda e risco de morte (BRIZENDINE; BADDLEY; PAPPAS, 2011).

Nos indivíduos sintomáticos, predominam os sintomas como a febre e a tosse com expectoração mucoide, por vezes com hemoptise. Sintomas como suores noturnos, emagrecimento e fraqueza podem estar presentes, assim como na tuberculose, o que pode gerar dificuldades no diagnóstico diferencial destas infecções. Dor ao respirar, ventilatório-dependente, pode ser observada quando a lesão está junto à pleura. É comum a doença manifestar-se como pneumonia, frequentemente multifocal, segmentar ou lobar. A evolução para formas pulmonares graves com insuficiência respiratória aguda tem sido descrita particularmente em pessoas vivendo com HIV/aids. Apresentações clínicas como pneumotórax e pneumonia criptocócica alérgica são reportadas como formas clínicas inusitadas (MORETTI *et al.*, 2008).

Em um hospedeiro imunocompetente pode ocorrer infecção pulmonar subclínica isolada em cerca de um terço dos indivíduos, identificada simplesmente por uma radiografia torácica anormal. A formação de lesões pulmonares condensadas maciças é mais frequente em infecções causadas por *C. gattii*, podendo até serem confundidas com neoplasias (YANG *et al.*, 2006). Vários casos de criptococose pulmonar grave e sintomática em indivíduos aparentemente imunocompetentes ocorreram durante o surto de criptococose por *C. gattii*, na Ilha de Vancouver, Canadá (PHILLIPS *et al.*, 2015).

O envolvimento pulmonar varia de 10% a 55% nos indivíduos com meningoencefalite criptocócica associada à HIV/aids, embora os sintomas neurológicos possam predominar (BRIZENDINE; BADDLEY; PAPPAS, 2011).

### Infecção no SNC (neurocriptococose)

As manifestações clínicas da infecção no SNC incluem uma miríade de sinais e sintomas, como cefaleia, febre, neuropatias, alteração do status mental, letargia, perda de memória e sinais de inflamação meníngea (PERFECT, 2015). Cefaléia e febre estão presentes em 76% e 65% dos casos, respectivamente (MORETTI *et al.*, 2008).

Em indivíduos gravemente imunocomprometidos, como pessoas vivendo com HIV/aids, a carga fúngica é geralmente elevada, e pode atingir celularidade de mais de um milhão de leveduras por mililitro de líquido cefalorraquidiano (LCR). Nestes casos, o início dos sinais e sintomas pode ser mais rápido, os títulos de antígenos polissacarídicos no LCR são mais altos e a pressão liquórica pode atingir níveis mais elevados do que nos indivíduos imunocompetentes (SHANKAR *et al.*, 2007).

Em indivíduos imunocompetentes o quadro clínico da infecção no SNC é complexo e heterogêneo: náuseas, vômitos, rigidez de nuca, alterações de consciência, déficit de memória, linguagem e cognição, estrabismo, diplopia, paralisia facial, déficit visual ou amaurose (de caráter temporário ou definitivo) podem ser observados (MORETTI *et al.*, 2008).

Lesão tumoral ou criptococoma, uma das manifestações de criptococose cerebral, se caracteriza pela formação de uma massa intracraniana de células leveduriformes. Os locais mais comuns para o surgimento de criptococomas incluem os gânglios da base, cerebelo ou lobo parietal, e mais raramente a área intra-espinhal e a ponte encefálica (LI *et al.*, 2010; VELAMAKANNI *et al.*, 2014).

Vários fatores estão associados a um pior prognóstico da neurocriptococose: (1) Elevada carga fúngica; (2) Alterações sensoriais no início das manifestações clínicas (indivíduos obnubilados, torporosos ou em coma apresentam pior prognóstico); (3) Ausência de resposta inflamatória no LCR (observado pela baixa celularidade inflamatória); (4) Presença de manifestação fora do SNC (pulmões, sangue, fígado, pele, dentre outros); (5) Imunocomprometimento drástico (linfócitos T CD4+ < 50 cels/mm<sup>3</sup>) (MORETTI *et al.*, 2008).

#### 1.2.5 Diagnóstico laboratorial

A anamnese do paciente e o seu quadro clínico são parâmetros iniciais para o diagnóstico da criptococose, e o diagnóstico definitivo se dá pelo isolamento de *Cryptococcus* spp. em cultivo ou pela detecção do fungo em espécime clínico através da microscopia (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

Pode se dizer que a criptococose é uma das micoses de mais fácil diagnóstico, por apresentar características importantes, como por exemplo, a presença da cápsula típica envolvendo a parede celular do *Cryptococcus* spp., o marcante tropismo pelo SNC com abundância de elementos fúngicos no LCR e coloração histopatológica

específica para a cápsula de levedura (MORETTI *et al.*, 2008). Um diagnóstico rápido e eficaz, seguido de uma conduta terapêutica antifúngica correta, é fundamental para um melhor prognóstico da criptococose (SAHA *et al.*, 2009).

#### Exame micológico direto

O método mais rápido de diagnóstico de meningite criptocócica é a microscopia direta do LCR através da preparação com tinta da China (também chamada nigrosina ou tinta Nankin). Entretanto, a sensibilidade da preparação pela tinta da China depende da carga fúngica, considerada satisfatória quando se tem uma concentração maior que  $10^3$  UFC/ml. A sensibilidade do teste é de 30% a 50% na meningite criptocócica não relacionada à HIV/aids e até 80% nos casos de doença relacionada à HIV/aids. A centrifugação do LCR e da urina por 10 minutos em baixa rotação aumenta bastante a sensibilidade do teste, recomendando-se sempre centrifugar (MORETTI *et al.*, 2008; MAZIARZ; PERFECT, 2016).

No exame direto, evidenciam-se leveduras encapsuladas, de formato arredondado ou oval, de tamanho variável, podendo apresentar ou não brotamentos. O uso das soluções de potassa (KOH a 10%) com tinta da China, para a contracoloração em microscopia óptica comum, e a solução de branco de calcoflúor a 0,1%, para a microscopia de fluorescência, facilita a visualização dos elementos fúngicos. A solução de potassa é empregada com a finalidade de se eliminar a maioria das células do hospedeiro e/ou outros artefatos passíveis de serem confundidos com *Cryptococcus* spp (MORETTI *et al.*, 2008).

#### Exame histopatológico

*Cryptococcus* spp. pode ser identificado por coloração histológica de tecidos do pulmão, pele, medula óssea, cérebro e outros órgãos (SHIBUYA *et al.*, 2001).

A histopatologia promove a observação das características micromorfológicas da levedura em fragmentos de tecidos, podendo apresentar um maior destaque das células fúngicas, de acordo com a técnica de coloração empregada. Dentre as diferentes técnicas histoquímicas, podemos citar a coloração convencional por Hematoxilina e Eosina (H&E), coloração de Grocott-Gomori (através da Metenamina de Prata, evidenciando as estruturas fúngicas da parede celular em coloração negra), coloração de Mucicarmim de Mayer (pigmentando a cápsula em tom avermelhado) e



coloração de Fontana-Masson (evidenciando a melanina fúngica em tom marrom-avermelhado) (GAZZONI *et al.*, 2009; KWON-CHUNG *et al.*, 2014).

A coloração histopatológica e a citologia de líquidos orgânicos como o LCR e outros fluidos corporais centrifugados se mostra mais sensível do que a contracoloração pela tinta da china (MALABONGA; BASTI; KAMHOLZ, 1991; SATO *et al.*, 1999). Entretanto, estas técnicas requerem equipamentos e treinamento mais aprimorados quando comparado à microscopia tradicional.

### Cultivo de espécimes clínicos

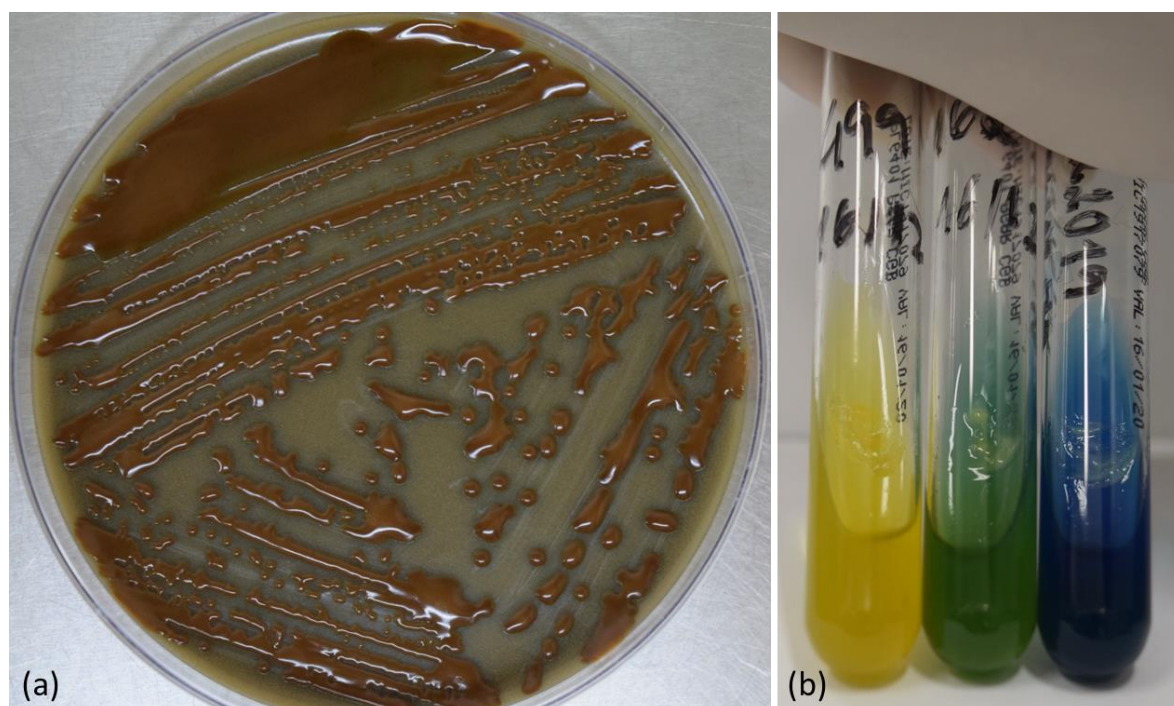
O cultivo é o exame padrão ouro comprobatório da criptococose, pois permite o isolamento do agente causal da infecção. *Cryptococcus* spp. pode ser facilmente isolado em cultivo a partir de amostras biológicas em meios de cultura de rotina utilizados tanto para a micologia quanto para a bacteriologia, como agar sangue, agar Sabouraud dextrose (SDA) e agar infusão de cérebro e coração (BHI), desde que não seja acrescido o antifúngico cicloheximida em sua composição. Colônias de cor branca a creme e de aparência mucóide (relacionada a presença de cápsula mucopolissacarídica) são geralmente observadas após 48 a 72 horas de incubação a 25 a 37 °C (com termotolerância de 40 °C) em aerobiose. Apesar do crescimento relativamente rápido, culturas devem ser mantidas por até quatro semanas, particularmente para indivíduos em tratamento com fármacos antifúngicos (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

Após o isolamento, provas bioquímicas auxiliam na identificação de *Cryptococcus* spp., como a detecção da enzima urease através do cultivo em agar ureia (ou agar Christensen) e a produção do pigmento melânico (por meio da enzima fenol-oxidase) pelo cultivo em agar semente de níger (NSA), a base de *Guizotia abyssinica* (LACAZ *et al.*, 2002) (Figura 2).

A diferenciação das espécies pode ser feita através do cultivo no CGB, que fornece dois níveis de seleção, onde *C. neoformans* é sensível ao aminoácido canavanina e incapaz de assimilar o aminoácido glicina, enquanto *C. gattii* é resistente à canavanina e utiliza a glicina como fonte de carbono e nitrogênio. A assimilação de glicina tem como resultado a mudança do pH do meio e, consecutivamente, a mudança da cor original do meio, de amarelo-esverdeado para azul cobalto (KWON-CHUNG; POLACHECK; BENNETT, 1982) (Figura 2). A distinção ao nível de espécie ou subespécie é importante, e fortemente recomendada, devido a diferenças

epidemiológicas, de virulência, de perfil de suscetibilidade aos fármacos antifúngicos, e, conseqüentemente, de desfecho clínico (FIRACATIVE; TRILLES; MEYER, 2012).

Figura 2 – Aspecto macroscópico do cultivo dos agentes da criptococose nos meios agar semente de níger (a) e agar canavanina-glicina-azul de bromotimol (b), sendo este último, da esquerda para a direita: CGB negativo (*C. neoformans*), CGB indeterminado e CGB positivo (*C. gattii*).



Fonte: Elaboração própria.

A cultura do LCR de indivíduos vivendo com HIV/aids quase sempre é positiva (95-100%), devido ao alto número de elementos fúngicos. Em indivíduos sem aids, as culturas do LCR são positivas em 90% dos casos, podendo ser maior quando se utiliza uma quantidade maior de inóculo ou realiza-se a centrifugação. Nos quadros mais graves de disseminação, a hemocultura pode revelar a criptococemia (BACKES *et al.*, 2016).

A cultura de urina é de grande utilidade nas formas disseminadas da criptococose, apresentando ou não o acometimento meníngeoencefálico, principalmente por ser de fácil obtenção. Recomenda-se a coleta de urina matinal, em três dias consecutivos, e o cultivo em NSA (PINTO JUNIOR *et al.*, 2006).

Além das técnicas de cultivo convencionais para o isolamento de *Cryptococcus* spp., atualmente existem também as técnicas de quantificação de leveduras viáveis. A cultura quantitativa de leveduras, feita a partir da inoculação em placa de diluições

seriadas de LCR, permite tanto a apreciação da carga fúngica quanto o monitoramento da eficácia antifúngica durante o tratamento (DAY *et al.*, 2013). Esta técnica tornou-se uma importante ferramenta de pesquisa para a avaliação da atividade de novos esquemas terapêuticos para a meningite criptocócica, porém, apesar de uma década de validação em estudos clínicos de fase II, a utilização de culturas quantitativas ainda não se tornou parte da rotina clínica (BICANIC *et al.*, 2007). Várias metodologias de cultura quantitativa são usadas para determinar a carga fúngica no LCR, no entanto, a reprodutibilidade entre as técnicas é desconhecida.

#### Métodos automatizados e semi-automatizados

Os testes laboratoriais automatizados e semi-automatizados têm nítidas vantagens em relação a padronização, reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados, além de promover a economia em relação ao gasto de reagentes e a diminuição do tempo de liberação dos resultados (PFALLER *et al.*, 2014).

O sistema VITEK® 2 (bioMérieux) é uma ferramenta totalmente automatizada que permite a identificação e a avaliação da suscetibilidade antifúngica de espécies de leveduras de interesse médico, como os gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* e *Trichosporon* (GRAF *et al.*, 2000). A partir de uma cultura prévia, este sistema preenche, lacra e transfere automaticamente os cartões de identificação de leveduras (ID-YST), que contém 64 poços com substratos específicos de 47 testes bioquímicos, para uma incubadora acoplada a um sistema de monitoramento que utiliza a fluorescência para acompanhar o crescimento do organismo e suas reações bioquímicas/metabólicas. As informações obtidas após a incubação, que em geral dura 15h, geram perfis metabólicos que são armazenados e comparados ao banco de dados do sistema. Nos casos de identificação com baixa discriminação de espécies, o sistema sugere testes adicionais para a demonstração de blastosporos, artrosporos, pseudo-hifas, hifas, cápsula mucopolissacarídica, crescimento a 37 °C, entre outros (MASSONET *et al.*, 2004).

Entretanto, divergências entre os sistemas comerciais de identificação, como VITEK® 2, API® ID (bioMérieux) e AuxaColor™ (Bio-Rad), demonstram a necessidade de se reconsiderar a utilidade dessas ferramentas, principalmente quando novos métodos de identificação, como a espectrometria de massa com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo de voo -

*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization and Time of Flight* - (MALDI-TOF), possibilitam a redução do tempo de liberação de resultados e/ou não exigem testes adicionais para confirmação de espécies (POSTERARO *et al.*, 2015).

O MALDI-TOF é uma ferramenta rápida de identificação de bactérias e fungos que tem sido amplamente adotada na rotina diagnóstica, principalmente em centros de pesquisa e laboratórios de referência. Dois sistemas comerciais de MALDI-TOF podem ser encontrados no mercado: o MALDI Biotyper® (Bruker Daltonics) e o VITEK® MS (bioMérieux). Esta técnica consiste na aplicação do material a ser identificado, seja uma colônia microbiana ou um espécime clínico, em uma placa metálica contendo uma matriz polimérica que sofre irradiação/dissorção por um laser, vaporizando o conteúdo da amostra e ionizando suas moléculas, que são levadas a um detector por um tubo à vácuo. Este detector mensura o chamado tempo de voo de cada molécula da amostra que é encaminhado para o sistema do equipamento produzindo, em poucos minutos, padrões específicos de espectros de massa de peptídeos e proteínas permitindo a identificação de espécies microbianas através da comparação com banco de dados (WIESER *et al.*, 2012).

MALDI-TOF fornece um método confiável, rápido e altamente reproduzível para a identificação de *C. neoformans* var. *grubii*, *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. gattii*, juntamente com outras espécies do gênero, e diferenciação dos principais tipos moleculares dentro dos complexos de espécies, além da detecção de cepas híbridas inter e intra espécies (FIRACATIVE; TRILLES; MEYER, 2012; MCTAGGART *et al.*, 2011; POSTERARO *et al.*, 2012). A identificação destes tipos moleculares utilizando o MALDI-TOF é um avanço significativo, visto que os métodos moleculares atualmente utilizados para esta finalidade incluem, em geral, além do cultivo prévio, a extração do ácido desoxirribonucleico (DNA), a amplificação pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), o uso de enzimas de restrição e a técnica de eletroforese em gel (FIRACATIVE; TRILLES; MEYER, 2012).

#### Diagnóstico sorológico e testes “*point-of-care*”

Durante a infecção por *Cryptococcus* spp., antígenos capsulares polissacarídicos solúveis são encontrados em fluidos corporais, o que permite que estes sejam identificados e quantificados.

O teste sorológico de detecção de antígenos capsulares de *Cryptococcus* spp. através da aglutinação em látex pode ser realizado em sangue, urina, lavado brônquio

alveolar e no LCR, no entanto, a detecção de antígeno no LCR e no soro são mais rotineiras. LCR e soro são positivos em mais de 90% dos indivíduos com meningoencefalite, enquanto infecções fora do SNC fornecem menor positividade do teste. A aglutinação positiva em uma diluição de 1:4 é altamente sugestiva de infecção criptocócica. Títulos maiores ou iguais a 1:8 geralmente indicam doença ativa. Indivíduos com aids, em geral, apresentam altos títulos do antígeno (PEDROSO; FERREIRA; CANDIDO, 2006).

Entretanto, resultados falso-positivos dos testes de aglutinação em látex podem ocorrer em títulos iguais ou menores que 1:8 (TANNER *et al.*, 1994) e falso-negativos podem ocorrer em títulos extremamente altos (STAMM; POLT, 1980), devido a um efeito prozona, quando ocorre grande quantidade de antígenos na amostra. Este problema pode ser superado através da diluição de amostras. Nos estágios iniciais da infecção ou nas infecções crônicas, a baixa carga fúngica também pode causar resultados falso-negativos em testes de aglutinação em látex (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

Alguns ensaios imunoenzimáticos foram desenvolvidos para detectar antígenos ou anticorpos contra *C. neoformans*. Quando comparados ao teste de aglutinação em látex, a técnica de ELISA é mais eficiente, capaz de detectar o antígeno mesmo em pequena concentração na amostra, além de não sofrer interferência do fator reumatoide (MITCHELL; PERFECT, 1995).

Melhoras significativas no diagnóstico da criptococose foram obtidas com o desenvolvimento de testes sorológicos para o antígeno capsular polissacarídeo criptocócico, produzidos durante todo o curso da infecção. O teste imunocromatográfico chamado ensaio de fluxo lateral do antígeno criptocócico - *Cryptococcal Antigen Lateral Flow Assay* - (CrAg LFA), recentemente introduzido no mercado (HANSEN *et al.*, 2013; RUGEMALILA *et al.*, 2013), é um teste “*point-of-care*” do tipo fita para a detecção de antígeno criptocócico, que utiliza dois anticorpos monoclonais capazes de reconhecer os quatro sorotipos de *Cryptococcus* spp.

O CrAg LFA preenche todos os requisitos para um teste “*point-of-care*”: baixo custo, excelente desempenho, simples execução e rapidez para obtenção do resultado, disponível em 10 minutos, além de estabilidade a variações de temperatura (não requer acondicionamento refrigerado) e baixíssima reatividade cruzada a outros antígenos fúngicos (ANDERSON; CROWE; GARCIA, 2011).

Resultados falso-positivos apresentam uma taxa menor que 1%, e estão geralmente relacionados com falhas técnicas ou reatividade a outras infecções (reação cruzada com antígenos de *Trichosporon* sp., por exemplo). A positividade do teste pode ocorrer antes mesmo da detecção do crescimento em cultura (PERFECT; BICANIC, 2015).

O CrAg LFA apresenta sensibilidade e especificidade superiores a 98% para utilização no soro e no LCR, e sensibilidade de 85% na urina (HUANG *et al.*, 2015; KABANDA *et al.*, 2014). A especificidade do CrAg LFA para amostras de urina pode ser aumentada por um procedimento simples proposto por Brito-Santos e col. (2017), que consiste no aquecimento da urina fresca a uma temperatura de 100 °C por cinco minutos antes da realização do teste, sem o comprometimento de sua sensibilidade. Além do soro e da urina, o sangue periférico total, obtido pela punção da polpa digital, também pode ser usado na realização do CrAg LFA (WILLIAMS *et al.*, 2015).

A positividade do CrAg LFA permite que seja iniciada a terapia antifúngica apropriada de forma rápida e consciente, reduzindo o risco de morte, além de apresentar indicação para a triagem preventiva de casos de criptococose em regiões e em indivíduos suscetíveis a infecção (PRATTES *et al.*, 2016).

O CrAg LFA possibilitou estudos de coorte em diversas regiões no mundo, tendo um deles revelado uma prevalência de 2% a 21% de antigenemia criptocócica assintomática em indivíduos infectados pelo HIV com contagens de células CD4+  $\leq$  100 /  $\mu$ L (MEYA *et al.*, 2010).

Todavia, o CrAg LFA não é uma ferramenta de monitoramento da resposta ao tratamento, uma vez que a depuração do antígeno criptocócico no organismo é lenta e, mesmo durante terapia antifúngica eficaz, os títulos podem permanecer elevados (ANTINORI *et al.*, 2005; BROUWER *et al.*, 2005; GRINSELL *et al.*, 2001), sendo assim, seu uso deve se manter exclusivo para o diagnóstico.

### Diagnóstico por imagem

As imagens radiográficas de tórax podem servir de auxílio para o diagnóstico da criptococose pulmonar, que pode se apresentar de diferentes formas, ressaltando que as imagens pulmonares localizadas sugestivas, como massas e nódulos, predominam no paciente imunocompetente, enquanto no imunocomprometido há o predomínio de infiltrado intersticial e de opacidade intersticial difusa. Os nódulos

predominantes no paciente imunocompetente são resultantes de granulomas periféricos ou pneumonia granulomatosa (MILLER; EDELMAN; MILLER, 1990).

Entretanto, não existe um padrão radiológico característico de criptococose, embora nódulos (únicos ou múltiplos) bem definidos e não calcificados, sejam muito comuns na doença (CHEN *et al.*, 2001). Apesar de múltiplas estratégias de diagnóstico, a presença de sintomas inespecíficos e o desconhecimento sobre os fatores de risco em populações susceptíveis dificultam o diagnóstico precoce da criptococose, condição crítica para um melhor prognóstico da doença. Por exemplo, o período entre o início dos sintomas e o diagnóstico da meningite criptocócica em indivíduos vivendo com HIV/aids e receptores de transplantes é de duas a três semanas na maioria dos casos. Nos demais casos, sem a infecção pelo HIV ou recebimento de transplante, este intervalo pode dobrar, apresentando um pior desfecho clínico apesar de disponibilidade de tratamento (BRATTON *et al.*, 2012).

#### 1.2.6 Tratamento

A importância do diagnóstico precoce para o bom prognóstico da criptococose já foi abordada neste trabalho, entretanto, tão importante quanto um rápido diagnóstico é a escolha de um tratamento efetivo. A terapia com fármacos antifúngicos continua sendo a principal linha de tratamento das infecções criptocócicas.

Segundo Mouraud e Perfect (2018), os princípios terapêuticos para o manejo efetivo da meningite criptocócica são: (1) O diagnóstico precoce, que possibilita o tratamento de uma infecção de menor carga fúngica, conseqüentemente, menos agressiva; (2) A identificação de fatores de risco, novos e antigos, bem como suas variações, para o uso adequado dos biomarcadores da doença; (3) Um regime antifúngico que possibilite a rápida eliminação de leveduras viáveis presentes no espaço subaracnóideo; (4) Bom gerenciamento das complicações graves da meningite criptocócica, incluindo o aumento da pressão intracraniana e o desenvolvimento da síndrome inflamatória da reconstituição imune (SIRI); (5) Busca de uma maior compreensão acerca dos testes de susceptibilidade *in vitro* para a definição dos casos de resistência (visto que não existem *break points* validados para os antifúngicos) e a identificação de cepas geneticamente distintas e possivelmente mais virulentas; (6) Controle das comorbidades subjacentes; (7) Objetivar a redução da mortalidade, porém, a morbidade também deve ser reduzida.

## Anfotericina B

A anfotericina B, da classe dos polienos, tem sido a base do tratamento da meningite criptocócica por décadas. Esta droga exerce seu efeito fungicida ligando-se ao ergosterol da parede celular criptocócica, formando poros na membrana celular e induzindo a morte celular oxidativa (ANDERSON *et al.*, 2014; BELENKY; CAMACHO; COLLINS, 2013).

Seu uso está associado à redução significativa da carga fúngica no SNC e a melhoria da sobrevivência nos casos da doença (SLOAN; PARRIS, 2014). A combinação de anfotericina B com flucitosina, um análogo fluorado das pirimidinas, demonstrou ser um esquema terapêutico de melhor efeito fungicida e de melhor sobrevida quando comparado ao tratamento com apenas anfotericina B (BROUWER *et al.*, 2004; DAY *et al.*, 2013; DROMER *et al.*, 2008).

Molloy e col. (2018) demonstraram recentemente a superioridade dessa combinação em um grande estudo multicêntrico randomizado (*Advancing Cryptococcal Meningitis Treatment for Africa*) com 721 indivíduos adultos infectados pelo HIV, recrutados em nove centros de referência africanos. Esta combinação, apesar de ser altamente recomendada pelas diretrizes internacionais de tratamento da criptococose, apresenta desafios substanciais como: A administração exclusivamente por via intravenosa, alto custo de aquisição e dificuldades no monitoramento e gerenciamento dos eventos adversos com risco de morte, devido a sua notável toxicidade (que inclui nefrotoxicidade e anemia) (LOYSE *et al.*, 2013; MAY *et al.*, 2016).

## Flucitosina

A flucitosina age bloqueando a síntese de DNA e/ou a síntese de proteínas, causando um efeito fungistático em *Cryptococcus* spp., agindo sinergicamente com anfotericina B (BROUWER *et al.*, 2004). Esta droga apresenta potencial mielotóxico e hepatotóxico, e seu uso deve ser monitorado por marcadores laboratoriais avaliados por hemograma, hepatograma e função renal (MORETTI *et al.*, 2008).

## Fluconazol

O fluconazol, da classe dos azóis, tem um efeito fungistático sobre *Cryptococcus* spp., através da inibição da conversão de lanosterol em ergosterol, um



componente essencial da membrana da célula fúngica. Por isso, é menos eficaz no combate a infecção, não sendo recomendado para a terapia inicial (MAY *et al.*, 2016). Para se obter um efeito terapêutico significativo nas infecções do SNC, deve existir baixa carga de leveduras ou altas doses da droga (ABERG *et al.*, 2002; MUSSINI *et al.*, 2004; VIBHAGOOOL *et al.*, 2003).

Entretanto, doses relativamente altas de fluconazol são utilizadas na fase de consolidação após terapia de indução, para um período recomendado de oito semanas, onde tem se demonstrado superior a outros azóis, como o itraconazol (BICANIC *et al.*, 2015; PERFECT *et al.*, 2010).

O uso da anfotericina B, para a redução da carga fúngica, combinada ao fluconazol se faz necessário para o sucesso terapêutico em contextos de recursos limitados (BICANIC *et al.*, 2007; ROBINSON *et al.*, 1999). Para outras infecções criptocócicas, como a criptococose pulmonar, a monoterapia com fluconazol é recomendada como tratamento para doença leve a moderada (PERFECT *et al.*, 2010).

#### Itraconazol, voriconazol e posaconazol

O itraconazol parece tratar com sucesso a meningite criptocócica, mas a sua má absorção e a limitada penetração no SNC fazem com que seja pouco fiável (MOURAD; PERFECT, 2018). O voriconazol, que penetra bem no SNC, teve algum sucesso em tratamento, particularmente em hospedeiros normais (YAO *et al.*, 2015). O posaconazol tem excelente atividade contra o *Cryptococcus* spp. mas tem penetração limitada no SNC (PITISUTTITHUM *et al.*, 2005).

#### Isavuconazol

O estudo VITAL foi um rótulo aberto ensaio de fase III para avaliar o uso de isavuconazol oral e intravenoso para terapia primária ou de resgate de *Cryptococcus* spp. e infecções por micoses dimórficas. Dos nove indivíduos com infecções criptocócicas recebendo isavuconazol, 67% tiveram sucesso, sucesso parcial ou estabilidade da doença, com uma mortalidade de 11%. Além disso, dados preliminares sugerem que o isavuconazol tem uma adequada penetração no SNC e pode ter um papel importante no tratamento das infecções do SNC (THOMPSON *et al.*, 2016).

Perfect e col. (2010) apresentam estratégias de tratamento para indivíduos com meningoencefalite criptocócica. Para indivíduos com coinfeção pelo HIV, por exemplo, o tratamento deve ser dividido em três fases: (1) Terapia de indução, com anfotericina B (0,7 a 1,0 mg / kg por dia por via intravenosa) e flucitosina (100 mg / kg por dia por via oral em 4 doses divididas) por pelo menos 2 semanas; seguido por (2) Terapia de consolidação, com fluconazol (400 mg [6 mg / kg] por dia por via oral) por um período mínimo de 8 semanas; subsequentemente, (3) Terapia de manutenção (supressora) com fluconazol - idealmente iniciada quando os resultados da cultura do LCR são negativos - por até 12 meses e/ou até que haja evidência de restauração da imunidade.

A terapia de indução tem por objetivo a redução efetiva ou total da carga fúngica e a terapia de consolidação compreende pela manutenção da negatividade micológica e normalização dos parâmetros clínicos e laboratoriais. Já a terapia de manutenção é preconizada pelo alto risco de reincidência nos indivíduos com acentuada imunocomprometimento (como nos indivíduos com aids, enquanto a contagem de células CD4+ for < 100 cels/mm<sup>3</sup>) (MORETTI *et al.*, 2008).

#### Resistência aos fármacos antifúngicos

A resistência aos antimicrobianos é frequente na maioria das doenças infecciosas, e com a criptococose não é diferente. A resistência adquirida é observada para todas as três classes principais de fármacos antifúngicos utilizadas contra *Cryptococcus* spp. (MAY *et al.*, 2016).

A resistência aos polienos é incomum, mas tem sido relatada em isolados de *C. neoformans* amplamente expostos a anfotericina B, apresentando alteração do local-alvo devido a mutações (KELLY *et al.*, 1994).

O tratamento com fluconazol torna-se passível de sofrer resistência secundária durante o seu uso prolongado, por ser fungistático. Por isso, não é recomendável para terapia de ataque, e sim, para a manutenção (BICANIC *et al.*, 2006; MORETTI *et al.*, 2008). O mecanismo central de resistência ao fluconazol é a seleção de subpopulações criptocócicas intrinsecamente resistentes, devido a alterações no alvo ou por mecanismo de bombas de efluxo (SIONOV *et al.*, 2009).

A monoterapia com flucitosina não é apropriada devido à rápida seleção de *Cryptococcus* spp resistente, levando ao fracasso do tratamento (MAY *et al.*, 2016).

## Imunoterapia

Siddiqui e col. (2005), em um estudo com 62 indivíduos infectados pelo HIV sob tratamento antifúngico para meningite criptocócica, demonstrou que os sobreviventes apresentaram concentrações mais elevadas de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 séricos quando comparados aos não-sobreviventes.

Estudos utilizando citocinas e outras substâncias imunomoduladoras, como IL-12 e IL-18 (KAWAKAMI *et al.*, 1999), TNF- $\alpha$  (COLLINS; BANCROFT, 1992), IL-2 e IFN- $\gamma$  (ZHOU *et al.*, 2006) e anticorpos monoclonais contra a cápsula de *Cryptococcus* spp (LARSEN *et al.*, 2005) obtiveram resultados promissores, porém limitados, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Apesar da abundância de estudos *in vitro* e *in vivo* demonstrando a contribuição significativa da modulação imunológica para o curso das infecções criptocócicas, há uma falta de dados para fazer recomendações fortes para o uso de imunoterapia no tratamento dessas infecções (ANTACHOPOULOS; WALSH, 2012).

### 1.3 Identificação molecular dos complexos *C. neoformans* e *C. gattii*

De acordo com Meyer e Trilles (2010), apesar do crescente aumento das infecções pelos complexos *C. neoformans* e *C. gattii*, pouco se sabe sobre sua epidemiologia global, o que afeta diretamente o desenvolvimento de um enfrentamento clínico efetivo. Diante disso, é importante compreender a estrutura genotípica global da população criptocócica, que proporcionará aos técnicos de laboratório, pesquisadores e clínicos as ferramentas necessárias para avaliar o risco associado a genótipos específicos, permitindo a identificação do surgimento de cepas altamente virulentas e, conseqüentemente, uma intervenção rápida e eficaz nestes casos.

A importância dos complexos de espécies *C. neoformans* e *C. gattii* como patógenos humanos motivou diversos grupos de pesquisa a determinarem grupos moleculares geneticamente diversificados presentes em cada um dos sorotipos já identificados. Isto possibilitou estabelecer relações entre determinados genótipos e suas origens geográficas, o que resultou em uma significância epidemiológica destes subgrupos (MEYER; TRILLES, 2010).

Dentre os métodos moleculares empregados por estes grupos, podemos citar as técnicas de *DNA-fingerprinting* e *PCR-fingerprinting*, baseadas no uso de microssatélites ou iniciadores minissatélite (MEYER *et al.*, 2003; SPITZER; SPITZER, 1992); *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) (SORRELL *et al.*, 1996); *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) dos genes *URA5* e *PLB1* (LATOUCHE *et al.*, 2003; MEYER *et al.*, 2003); *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), que combina as técnicas de RAPD e RFLP (BOEKHOUT *et al.*, 2001); a aplicação de *Intergenic Spacer Sequences* (IGS) (DIAZ *et al.*, 2000); *Multilocus Sequence Typing* (MLST) e *Multilocus Microsatellite Typing* (MLMT) (KARAOGLU *et al.*, 2008; MEYER *et al.*, 2009).

Todas essas técnicas produzem resultados comparáveis, identificando 4 grupos geneticamente diversos para *C. neoformans* (VNI, VNII, VNIII e VNIV) e 4 para *C. gattii* (VGI, VGII, VGIII e VGIV) (MEYER *et al.*, 2003) (Quadros 1 e 2).

Quadro 1 - Concordância entre os diferentes métodos utilizados para a tipagem molecular do complexo *Cryptococcus neoformans*.

Genotipagem	Ref.	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>			AD híbrido	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>
PCR-fingerprinting	a	VNI	VNII	VNII	VNIII	VNIV
	f	VN6 (VN5)		VN7	VN3/VN4	VN1 (VN2)
AFLP	b	AFLP1	AFLP1A/1B	AFLP1A/1B	AFLP3	AFLP2
	e	VNI	VNB	VNII		
RFLP <i>URA5</i>	a	VNI	VNII	VNII	VNIII	VNIV
RFLP <i>PLB1</i>	c	A1	x	A2	A3	A4
ITS	d	ITS1	ITS1	ITS1	ITS1/TS2	ITS2
IGS	g	1A/1B	1A	1C	2C	2A/2B/2C
Sorotipo		A			AD	D
* Ref. - a) MEYER et al., 2003; b) BOEKHOUT et al., 2001; c) LATOUCHE et al., 2003; d) DIAZ et al., 2000; e) LITVINTSEVA, 2005; f) VIVIANI et al., 2006; g) KATSU et al., 2004.						

Fonte: Modificado de Meyer & Trilles (2010).

Quadro 2 - Concordância entre os diferentes métodos utilizados para a tipagem molecular do complexo *Cryptococcus gattii*.

Genotipagem	Ref.	<i>C. gattii</i>			
PCR-fingerprinting	a	VGI	VGII	VGIII	VGIV
	f				
AFLP	b	AFLP4A/4B	AFLP6	AFLP 5A/5B/5C	AFLP7
	e				
RFLP <i>URA5</i>	a	VGI	VGII	VGIII	VGIV
RFLP <i>PLB1</i>	c	A5	A6	A7	A8
ITS	d	ITS3/ITS7	ITS4	ITS5	ITS6
IGS	g	4	3	5	6
Sorotipo		B/C			
* Ref. - a) MEYER et al., 2003; b) BOEKHOUT et al., 2001; c) LATOUCHE et al., 2003; d) DIAZ et al., 2000; e) LITVINTSEVA, 2005; f) VIVIANI et al., 2006; g) KATSU et al., 2004.					

Fonte: Modificado de Meyer & Trilles (2010).

Com a proposta de padronização mundial da genotipagem das espécies dos complexos *Cryptococcus* spp., a Sociedade Internacional de Micologia Humana e Animal - *International Society for Human and Animal Mycology* - (ISHAM) desenvolveu um protocolo que utiliza a técnica de MLST baseada em regiões variáveis de sete *loci* genéticos independentes – os genes associados a virulência *CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5* e o espaçador intergênico IGS1 (Quadro 3).

Quadro 3: Descrição dos sete *loci* genéticos utilizados no esquema MLST para a genotipagem dos complexos de espécies *Cryptococcus* sp.

<b>Locus</b>	<b>Descrição</b>
<i>CAP59</i>	Gene associado à cápsula mucopolissacarídica
<i>GPD1</i>	Gene associado à gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
<i>LAC1</i>	Gene associado a lacase
<i>PLB1</i>	Gene associado à fosfolipase B1
<i>SOD1</i>	Gene associado à cobre-zinco superóxido dismutase
<i>URA5</i>	Gene associado à orotidina-monofosfato pirofosforilase
IGS1	Espaçador intergênico do RNA ribossômico

Fonte: Modificado de Meyer e col. (2009).

Os subtipos moleculares (STs) e os seus respectivos alelos podem ser determinados através da comparação com o *International Fungal Multilocus Sequence Typing Database* (Fungal MLST Database), disponível em: <http://mlst.mycologylab.org/> (MEYER *et al.*, 2009). A técnica de MLST pode ser considerada o “padrão ouro” para a tipagem dos complexos *C. neoformans* e *C. gattii*, devido à boa reprodutibilidade da técnica e ao seu alto poder discriminatório (AGUIAR *et al.*, 2017).

Os avanços na tipagem molecular possibilitaram descobertas importantes sobre a epidemiologia dos complexos *C. neoformans* e *C. gattii*, como a identificação do agente causador da epidemia de criptococose em Vancouver, *C. gattii* genótipos VGIIa e VGIIb (KIDD *et al.*, 2004), e a identificação de um novo tipo molecular de *C. neoformans*, o genótipo VNB, em Botswana (LITVINTSEVA, 2005), inicialmente descrito como geograficamente restrito à África Subsaariana, hoje esporadicamente isolado em outras regiões do mundo, como na Europa (Cepa IUM 97-4515, ST102, isolada na Itália) e na América do Sul (Cepas Hamden C3-1 e LA511, isoladas no

Brasil e Colômbia, respectivamente) (NGAMSKULRUNGROJ *et al.*, 2009; COGLIATI, 2013). Posteriormente, Rhodes e col. (2017) propuseram a separação do genótipo VNB em duas linhagens distintas, VNBI e VNBII, a partir do sequenciamento completo do genoma de cepas de *C. neoformans* var. *grubii*. Além disso, em recente estudo, análises filogenéticas de isolados de *C. gattii* obtidos em florestas de miombo, na Zâmbia, revelaram a existência de uma nova linhagem desta espécie, consideravelmente divergente das linhagens anteriores, denominada VGV (FARRER *et al.*, 2019).

Diversos estudos foram realizados com a proposta de avaliar a influência do genótipo em características como patogenicidade, virulência, variantes morfológicas, desfecho e parâmetros clínicos. Dentre eles, Wiesner e col. (2012) realizaram estudos na África e demonstraram que os grupamentos filogenéticos mais letais desequilibraram a resposta de citocinas Th1/Th2, favorecendo a multiplicação e disseminação do patógeno, e, além disso, que certos grupamentos filogenéticos produziram maior quantidade de cápsula. Estudos *in vivo* mostraram que VNIII (híbrido AD) apresentava cepas altamente virulentas, dependendo de seu nível de heterozigosidade genômica (COGLIATI *et al.*, 2012). Adicionalmente, um estudo demonstrou que infecções por VNI apresentavam taxas de mortalidade mais elevadas em relação a VNIV em modelo murino, sugerindo que VNIV parece ser menos virulento que VNI (BARCHIESI *et al.*, 2005).

Ainda que a correlação entre as características genotípicas e as características clínico-epidemiológicas não esteja esclarecida, a identificação molecular dos agentes da criptococose se faz útil e necessária para a vigilância epidemiológica da distribuição dos diferentes padrões moleculares e dos genótipos descritos na literatura como mais virulentos e/ou resistentes aos fármacos antifúngicos (HAGEN *et al.*, 2015). Com isso, o presente trabalho visa contribuir com informações acerca da estrutura genética populacional de cepas brasileiras, clínicas e ambientais, do complexo *C. neoformans*, fornecendo dados para a Rede Brasileira de Criptococose.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Verificar a presença e a distribuição de STs descritos na literatura como mais virulentos e/ou resistentes aos fármacos antifúngicos entre cepas brasileiras do complexo *C. neoformans*, contribuindo para uma melhor compreensão da estrutura genética populacional deste complexo de espécies no Brasil.

### 2.2 Objetivos específicos

- Identificar os tipos moleculares e STs das cepas clínicas e ambientais do complexo *C. neoformans* provenientes de diferentes regiões do Brasil;
- Verificar a presença de tipos moleculares e STs circulantes no Brasil que sejam descritos na literatura como mais virulentos e/ou resistentes aos fármacos antifúngicos;
- Descrever a estrutura genética populacional encontrada nas cepas do complexo *C. neoformans* de diferentes regiões e estados do Brasil;
- Comparar a estrutura genética populacional encontrada nas cepas brasileiras do complexo *C. neoformans* com a estrutura genética populacional previamente descrita em outros países e continentes;



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Amostragem, seleção e recuperação das cepas

O projeto de pesquisa foi encaminhado a avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), e após análise da coordenação foi dispensada a necessidade de sua apreciação, podendo assim ser desenvolvido e submetido à publicação e divulgação dos resultados.

No estudo foram utilizadas cepas de *C. neoformans* mantidas na Coleção de Fungos Patogênicos (CFP) do INI, da Fiocruz, no Rio de Janeiro, provenientes de diferentes estados brasileiros e selecionadas a partir de uma amostragem por conveniência. A seleção das cepas foi realizada juntamente com o processo de recuperação, a fim de se determinar a viabilidade e pureza dos isolados de *C. neoformans*. A inviabilidade (ausência de crescimento) ou contaminação dos isolados foram consideradas como critério de exclusão para a seleção das amostras.

Foram selecionados 64 isolados clínicos (de 48 pacientes humanos) e 15 isolados ambientais de *C. neoformans* (n=79). As cepas têm como origem os estados brasileiros do Rio de Janeiro (RJ; n=41), Amazonas (AM; n=10), Piauí (PI; n=9), Roraima (RR; n=7), Pará (PA; n=6), Brasília - Distrito Federal (DF; n=3), Mato Grosso do Sul (MS; n=2) e Tocantins (TO; n=1). As amostras clínicas foram recuperadas de: LCR (n=43), hemocultura (n=7), aspirado de medula óssea (n=1), escarro (n=2), lavado broncoalveolar (n=1), e urina (n=1), sendo nove isolados sem a identificação do tipo de espécime clínico (desconhecido). Dentre as amostras ambientais: cinco foram isoladas de excrementos de aves domésticas (gaiolas), quatro de poeira domiciliar, quatro de oco de árvores (*Syzygium jambolanum*) e duas de postes de madeira (Figura 3).

A recuperação foi realizada por meio da inoculação em SDA à 2% com incubação à 28 °C durante 48 horas, e, simultaneamente, foi realizada a inoculação em NSA para a determinação da pureza dos isolados, nas mesmas condições de incubação. Após o crescimento em SDA à 2%, não havendo presença de contaminação em NSA, foi realizado o cultivo secundário em agar extrato de levedura-peptona-dextrose (YPD) acrescido de NaCl, mantido em incubação nas mesmas condições do cultivo inicial em SDA à 2%.

Figura 3 – Mapa representativo das regiões e estados brasileiros de acordo com as cepas do complexo de espécies *C. neoformans* utilizadas no estudo, evidenciando o número de cepas (n), a natureza do isolamento clínico ou ambiental (na cor azul e verde, respectivamente) e o material de isolamento.



Fonte: Elaboração própria.

### 3.2 Extração de ácidos nucleicos

A extração de ácidos nucleicos foi realizada de acordo com a metodologia de Ferrer e col. (2001). Com o auxílio de uma alça bacteriológica, uma pequena porção das colônias da cultura em YPD foi retirada, transferida para um tubo de microcentrífuga e congelada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  *overnight*.

Após o congelamento, foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de tampão de lise (17,3 mM de SDS, 230 mM de NaCl, 24,9 mM de EDTA e 200 mM de Tris-HCl) e 5  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol, seguido de agitação em vórtex com posterior incubação a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante uma hora, agitando em vórtex a cada 30 minutos. Foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), seguido por agitação em vórtex até obtenção de suspensão homogênea, e posteriormente, centrifugação à força centrífuga relativa (FCR) de 17.500 g durante 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, com adição de 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol, seguido por leve agitação manual e precipitação de DNA à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  *overnight*. Após a precipitação, foi realizada a centrifugação à FCR de 17.500 g durante 15 minutos, na temperatura de  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 500  $\mu\text{L}$  de solução de etanol 70%, onde foi retirada a porção líquida e feita a secagem do precipitado. Finalmente, o DNA foi suspenso em 100  $\mu\text{L}$  de água ultrapura estéril (Milli-Q) (FERRER *et al.*, 2001).

Após a extração, as amostras de DNA foram quantificadas através da técnica de espectrofotometria, utilizando o equipamento “BioPhotometer” (Eppendorf™). A quantificação é expressa na unidade de medida “ng/ $\mu\text{L}$ ”. Após a quantificação, as soluções contendo DNA foram diluídas com água ultrapura estéril (Milli-Q) para a concentração de 10 ng/ $\mu\text{L}$ .

### 3.3 Determinação do tipo sexual

O tipo sexual das cepas foi determinado pela metodologia de Halliday e col. (1999) com modificações, utilizando *primer's* específicos para os genes de feromônios: MFalfaU (5'-TTCAGTCCATCTTCACCACC-3'); MFalfaL (5'-TCTAGGCGATGACACAAAGGG-3') para o tipo sexual MAT-alpha e JOHE9787 (5'-ACACCGCCTGTTACAATGGAC-3'); JOHE9788 (5'-CAGCGTTTGAGAAGATGGACTTT-3') para o tipo sexual MAT-a (Fraser *et al.*, 2003).

A amplificação de ambos os genes foi realizada independentemente em um volume final de 50 µL contendo 50 ng de DNA, tampão de PCR 1X [200 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM de KCl - Invitrogen™], 0,2 mM de cada um dos nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP - Roche Diagnostics GmbH©), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,5 U de Taq Polymerase Platinum (Invitrogen™) e 50 ng de cada iniciador, em um termociclador (Modelo “hx0128 00208” - Eppendorf™), utilizando as seguintes condições de amplificação: 95 °C durante três minutos para a desnaturação inicial, 30 ciclos a 94 °C por um minuto, anelamento a 57,5 °C por um minuto, extensão a 72 °C por um minuto e extensão final a 72 °C por sete minutos.

Os produtos da amplificação foram analisados por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,4%, corado por Brometo de Etídio (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>BrN<sub>3</sub>), em uma voltagem de 100 V, utilizando um padrão de peso molecular de 250 Kb, onde foi utilizado uma amostra sem DNA como controle negativo e uma amostra padrão para cada tipo sexual do complexo *C. neoformans*: cepa ATCC 28957 do tipo sexual MAT-alpha e cepa ATCC 28958 do tipo sexual MAT-a.

### 3.4 Sequenciamento e comparação com o banco de dados de MLST

A técnica de PCR aplicada aos *loci* incluídos no MLST (genes *CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5* e a região IGS1) foi realizada de acordo com Meyer e col. (2009).

Cada reação foi feita com 50 ng de DNA de solução, 1X tampão de PCR [160 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 670 mM de Tris-HCl (pH 8,8 a 25 °C), 0,1% de Tween-20], 0,2 mM de cada um dos nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP - Roche Diagnostics GmbH©), 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,25U de Taq Polymerase Platinum (Invitrogen™) e 50 ng de cada um dos iniciadores. O volume final do “*mix*” é de 50 µL, obtido após a adição de água ultrapura livre de nucleases (MEYER *et al.*, 2009). As informações referentes aos *primer's* e condições de amplificação encontram-se disponíveis na página “<http://mlst.mycologylab.org/>”.

A sequência alvo foi amplificada em um termociclador (Modelo “hx0128 00208” - Eppendorf™). Os produtos da amplificação foram analisados por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,4%, corado por Brometo de Etídio (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>BrN<sub>3</sub>), em uma voltagem de 100 V, utilizando um padrão de peso molecular de 500 Kb, onde foi utilizado uma amostra sem DNA como controle negativo.

A purificação dos produtos da PCR (com a finalidade de remoção de dímeros de *primer's* e pequenos fragmentos de DNA) foi realizada de acordo com o protocolo utilizado por Rocha e col. (2018). Foram adicionados 50 µL de PEG (25 mM de Polietilenoglicol 8000 e 2,5 M de NaCl) em 50 µL do produto da amplificação, agitados em vórtex por 10 segundos, seguido de incubação à 37 °C por 15 minutos. Após a incubação, a solução foi centrifugada à FCR de 3.200 g por 15 minutos em temperatura ambiente, seguido do descarte do sobrenadante. Foram adicionados 125 µL de etanol 80% gelado, seguido de centrifugação à FCR de 1.800 g por dois minutos. Após a centrifugação, todo o sobrenadante foi descartado e o tubo foi incubado em banho seco a 60 °C para a evaporação dos resíduos alcoólicos. Após a evaporação, foram finalmente adicionados 30 µL de água Milli-Q, seguido de agitação em vórtex por 10 segundos e armazenamento a -20 °C.

O sequenciamento dos produtos da PCR foi realizado na plataforma de sequenciamento da Rede de Plataformas Tecnológicas do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde (PDTIS) da Fiocruz. O sequenciamento de diversos *loci* específicos foi utilizado para a identificação dos STs através da comparação com o perfil do banco de dados do Fungal MLST Database (disponível em: <http://mlst.mycologylab.org/>) (MEYER *et al.*, 2009).

### 3.5 Análise dos dados

Após o sequenciamento, os dados obtidos foram avaliados e editados nos softwares Sequencher 4.9 (Gene Codes Corporation™, Ann Arbor, MI, USA) e alinhados no software MEGA v6.06 - Molecular Evolutionary Genetics Analysis - (TAMURA *et al.*, 2013).

A análise filogenética foi feita com o software MEGA v6.06 pelo método *Neighbor-Joining*, utilizando as sequências combinadas dos genes *CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5* e a região IGS1 dos isolados estudados.

A combinação alélica foi analisada no software PHYLOViZ (<http://www.phyloviz.net/wiki/>) (FRANCISCO *et al.*, 2012) por meio do algoritmo *goeBURST* para inserir a população de isolados do presente estudo em um contexto mundial, utilizando 1723 sequências previamente publicadas de *C. neoformans* (VNI, VNII e VNB) de diversos continentes, além de determinar os prováveis genótipos fundadores.

O software DnaSP v5.10.1 (<http://www.ub.edu/dnasp/>) foi utilizado para as análises de coeficientes de diversidade haplotípica ( $H_d$ ) e nucleotídica ( $\pi$ ) e a presença ou ausência dos eventos de recombinação.

## 4 RESULTADOS

A população do complexo *C. neoformans* analisada no presente estudo contemplou sete Unidades Federativas de quatro das cinco regiões do Brasil (exceto a região Sul). A análise pela técnica de MLST demonstrou a presença de dez STs distintos: ST2 (n=1), ST5 (n=9), ST23 (n=4), ST32 (n=2), ST40 (n=10), ST41 (n=1), ST63 (n=1), ST77 (n=4), ST93 (n=45) e ST232 (n=2). Os genótipos ST2, ST5, ST23, ST32, ST63, ST77 e ST93 pertencem ao tipo molecular VNI (n=66), enquanto que os genótipos ST40 e ST41 pertencem ao tipo molecular VNII (n=11) e ST232 ao tipo molecular VNB (n=2). Dentre os 79 isolados brasileiros do complexo *C. neoformans* estudados, 72 foram identificados como tipo sexual MAT-alpha e 7 foram identificados como tipo sexual MAT-alpha/a (Tabela 1).

Os genótipos ST5 e ST93 foram identificados em diversos estados e no Distrito Federal, sendo o ST93 o genótipo mais comum, presente em maior número e identificado em todos os estados brasileiros contemplados neste estudo, exceto no estado do Tocantins; o ST23 identificado no Distrito Federal, Piauí e Roraima; o ST32 no Rio de Janeiro e no Tocantins; o ST77 no Pará e no Piauí; o ST2 apenas no Piauí; e o ST41 apenas no Mato Grosso do Sul. Os genótipos ST40, ST63 e ST232 foram encontrados somente no estado do Rio de Janeiro (Figura 5).

Todos os dez STs encontrados foram identificados em isolados clínicos. Entretanto, apenas quatro STs estavam presentes em ambos os tipos de isolamento, clínico e ambiental, sendo eles: ST5, ST23, ST77 e ST93. Os genótipos ST2, ST32, ST40, ST41, ST63 e ST232 foram identificados apenas em isolados clínicos (Figura 4).

A análise filogenética pelo algoritmo *Neighbor-Joining* foi feita com as cepas deste estudo combinadas a sequências previamente publicadas de cepas dos tipos moleculares VNI, VNB e VNII, e revelou a presença de quatro clusters principais: VNI C1, VNB, VNI C2 e VNII (Figura 4).

Tabela 1 - Lista das cepas analisadas no estudo, seu estado de origem (UF), a natureza do seu isolamento (clínico ou ambiental), o tipo de material de isolamento e seus respectivos resultados de identificação molecular (tipo sexual, tipo molecular principal e subtipo molecular).

<b>CFP</b>	<b>UF</b>	<b>ORIGEM</b>	<b>MATERIAL DE ISOLAMENTO</b>	<b>MAT</b>	<b>TM</b>	<b>ST</b>
<b>162</b>	AM	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>166</b>	AM	CLÍNICA	NI	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>168</b>	AM	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>169</b>	AM	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>170</b>	AM	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>496</b>	TO	CLÍNICA	LCR	alpha/a	<b>VNI</b>	<b>ST32</b>
<b>497</b>	RJ	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>498</b>	RJ	CLÍNICA	Urina	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>499</b>	RJ	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNB</b>	<b>ST232</b>
<b>500</b>	RJ	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNB</b>	<b>ST232</b>
<b>521</b>	RJ	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>522</b>	RJ	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>524</b>	RJ	CLÍNICA	Sangue	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>525</b>	RJ	CLÍNICA	Sangue	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>526</b>	RJ	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>527</b>	RJ	CLÍNICA	Sangue	alpha/a	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>528</b>	RJ	CLÍNICA	Sangue	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST32</b>
<b>529</b>	RJ	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>530</b>	RJ	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>531</b>	RJ	CLÍNICA	Escarro	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>532</b>	RJ	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNII</b>	<b>ST40</b>
<b>534</b>	RJ	CLÍNICA	Sangue	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST5</b>
<b>535</b>	RJ	CLÍNICA	LBA	alpha/a	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>536</b>	RJ	CLÍNICA	LCR	alpha/a	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>537</b>	RJ	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST5</b>
<b>538</b>	RJ	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>541</b>	RJ	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>542</b>	RJ	CLÍNICA	Sangue	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>543</b>	RJ	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNII</b>	<b>ST40</b>

*Continua*



<b>544</b>	RJ	CLÍNICA	AMO	alpha/a	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>545</b>	RJ	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>546</b>	RJ	CLÍNICA	LCR	alpha/a	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>549</b>	RJ	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNII</b>	<b>ST40</b>
<b>550</b>	RJ	CLÍNICA	Sangue	alpha	<b>VNII</b>	<b>ST40</b>
<b>657</b>	RJ	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNII</b>	<b>ST40</b>
<b>658</b>	RJ	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>659</b>	RJ	CLÍNICA	LCR	alpha/a	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>660</b>	RJ	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>661</b>	RJ	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNII</b>	<b>ST40</b>
<b>662</b>	RJ	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>664</b>	DF	CLÍNICA	NI	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST23</b>
<b>665</b>	AM	AMBIENTAL	MD	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>666</b>	AM	AMBIENTAL	PD	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>667</b>	AM	AMBIENTAL	PD	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>668</b>	AM	AMBIENTAL	PD	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST5</b>
<b>669</b>	AM	AMBIENTAL	MD	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST5</b>
<b>677</b>	PI	CLÍNICA	NI	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST23</b>
<b>679</b>	PI	CLÍNICA	NI	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST2</b>
<b>685</b>	PI	CLÍNICA	NI	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST77</b>
<b>688</b>	PI	CLÍNICA	NI	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>690</b>	PI	CLÍNICA	NI	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>692</b>	PI	CLÍNICA	NI	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST77</b>
<b>694</b>	PI	CLÍNICA	NI	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST5</b>
<b>695</b>	RJ	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>696</b>	RJ	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>697</b>	RJ	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNII</b>	<b>ST40</b>
<b>698</b>	RJ	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNII</b>	<b>ST40</b>
<b>699</b>	RJ	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNII</b>	<b>ST40</b>
<b>700</b>	RJ	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNII</b>	<b>ST40</b>
<b>701</b>	RJ	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST63</b>
<b>709</b>	RR	AMBIENTAL	OA	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST23</b>

*Continua*

<b>710</b>	RR	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>711</b>	RR	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>712</b>	RR	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>716</b>	PI	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>721</b>	PI	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>725</b>	RR	AMBIENTAL	PD	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST5</b>
<b>732</b>	RR	AMBIENTAL	OA	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST23</b>
<b>733</b>	RR	AMBIENTAL	OA	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>806</b>	PA	AMBIENTAL	EA	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST5</b>
<b>807</b>	PA	AMBIENTAL	EA	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST5</b>
<b>808</b>	PA	AMBIENTAL	EA	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST77</b>
<b>809</b>	PA	AMBIENTAL	EA	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST77</b>
<b>810</b>	PA	AMBIENTAL	EA	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST5</b>
<b>811</b>	PA	AMBIENTAL	OA	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>814</b>	MS	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNII</b>	<b>ST41</b>
<b>815</b>	MS	CLÍNICA	Escarro	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>878</b>	DF	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>
<b>879</b>	DF	CLÍNICA	LCR	alpha	<b>VNI</b>	<b>ST93</b>

**Legenda:**

CFP – Cadastro na Coleção de Fungos Patogênicos (INI/Fiocruz)

UF – Unidade Federativa

MAT – Tipo sexual

TM – Tipo molecular

ST – Subtipo molecular

AMO – Aspirado de medula óssea

EA – Excreta de aves

LBA – Lavado bronco-alveolar

LCR – Líquido cefalorraquidiano

MD – Madeira em decomposição

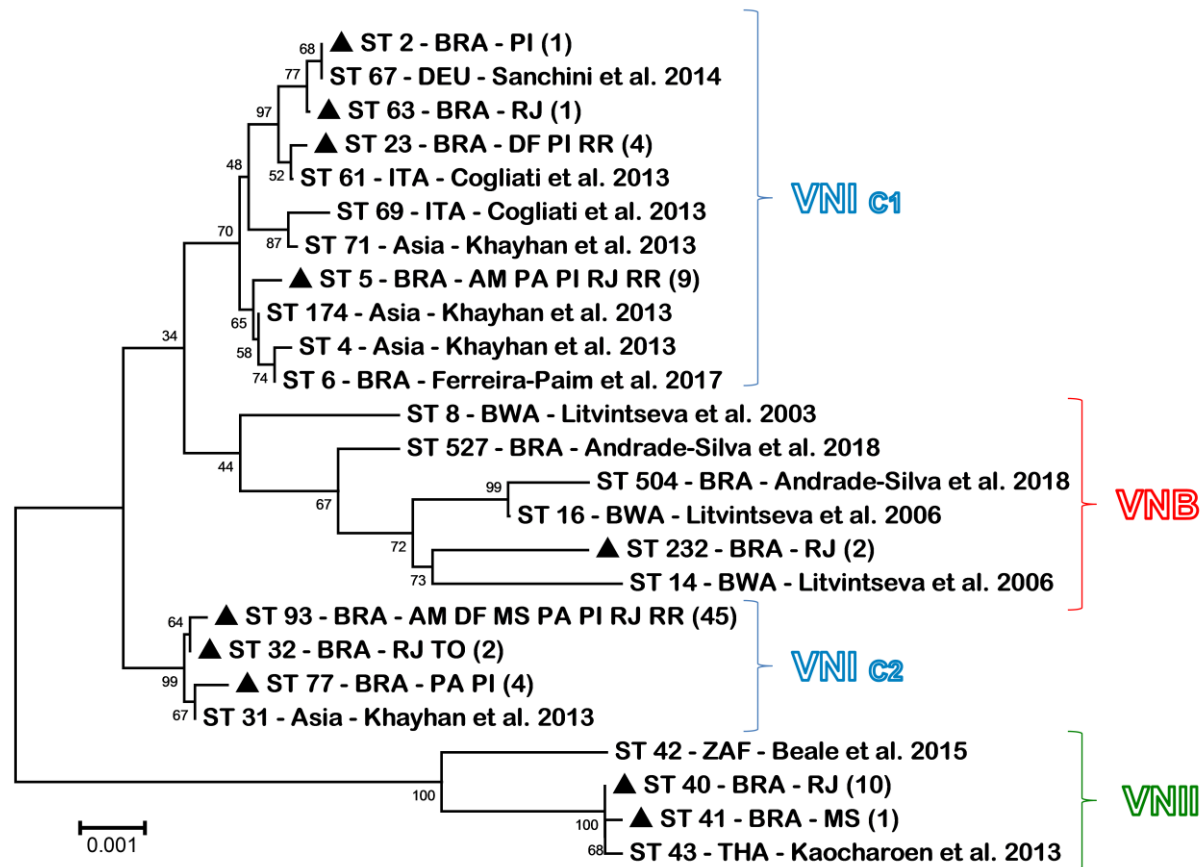
NI – Não identificado

OA – Oco de árvore

PD – Poeira domiciliar

Fonte: Elaboração própria.

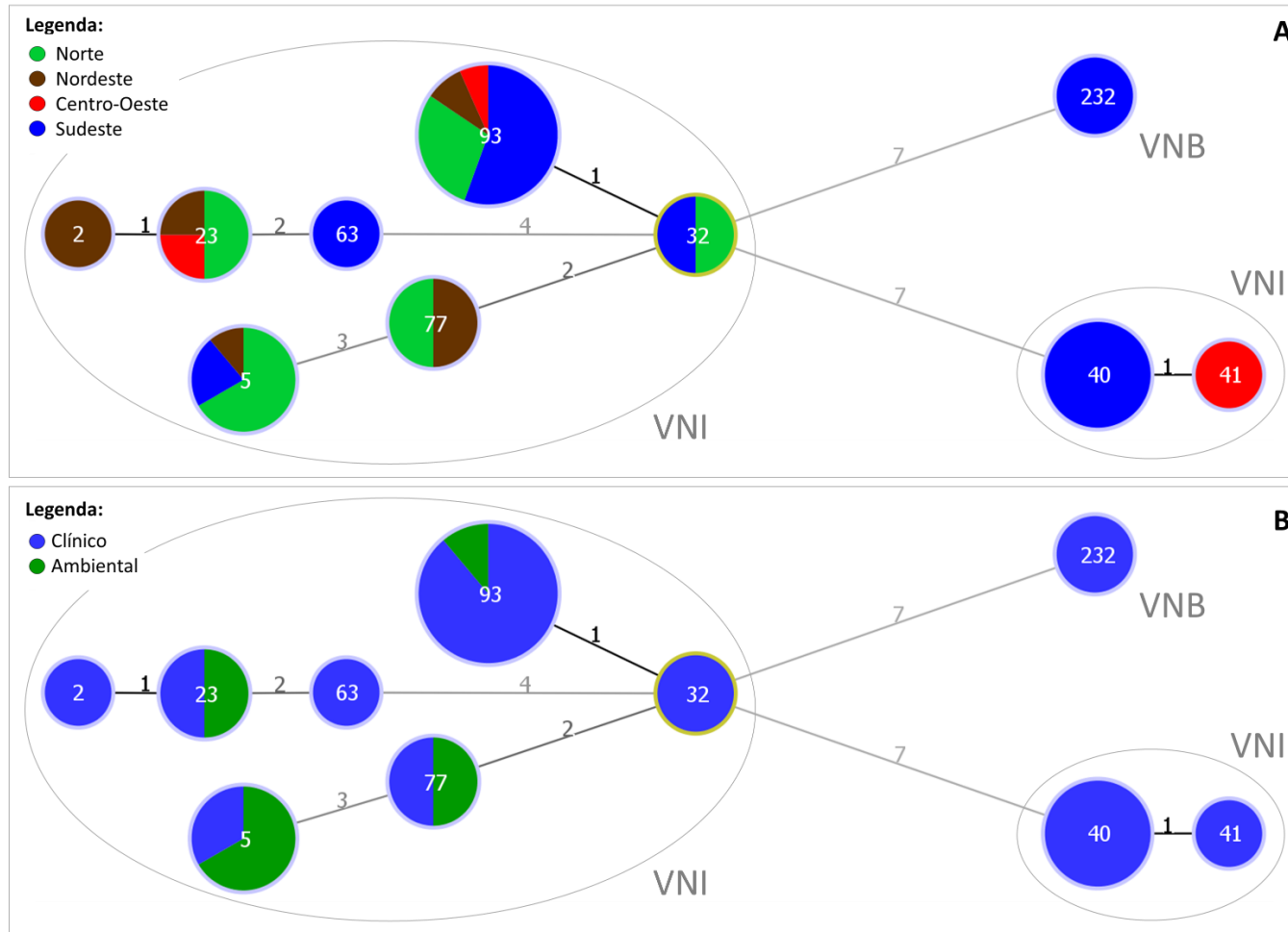
Figura 4 - Árvore filogenética pelo algoritmo *Neighbor-Joining*, software Sequencher 4.9, feita com as sequências combinadas dos genes *CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5* e a região IGS1 (sete *loci*) de 25 STs, sendo 10 STs do presente estudo (▲) mais 15 STs previamente publicados. Estão incluídos como dados de identificação: país de origem (código de países ISO 3166-1 alpha-3); Unidade Federativa e número de cepas entre parênteses (apenas para os STs do presente estudo); e citação bibliográfica. O número sobre os ramos são valores de suporte (*bootstrap*), obtidos a partir de 1000 pseudo-repetições. Podem ser observados quatro grupamentos principais: VNI C1, VNB, VNI C2 e VNIII.



Fonte: Elaboração própria.

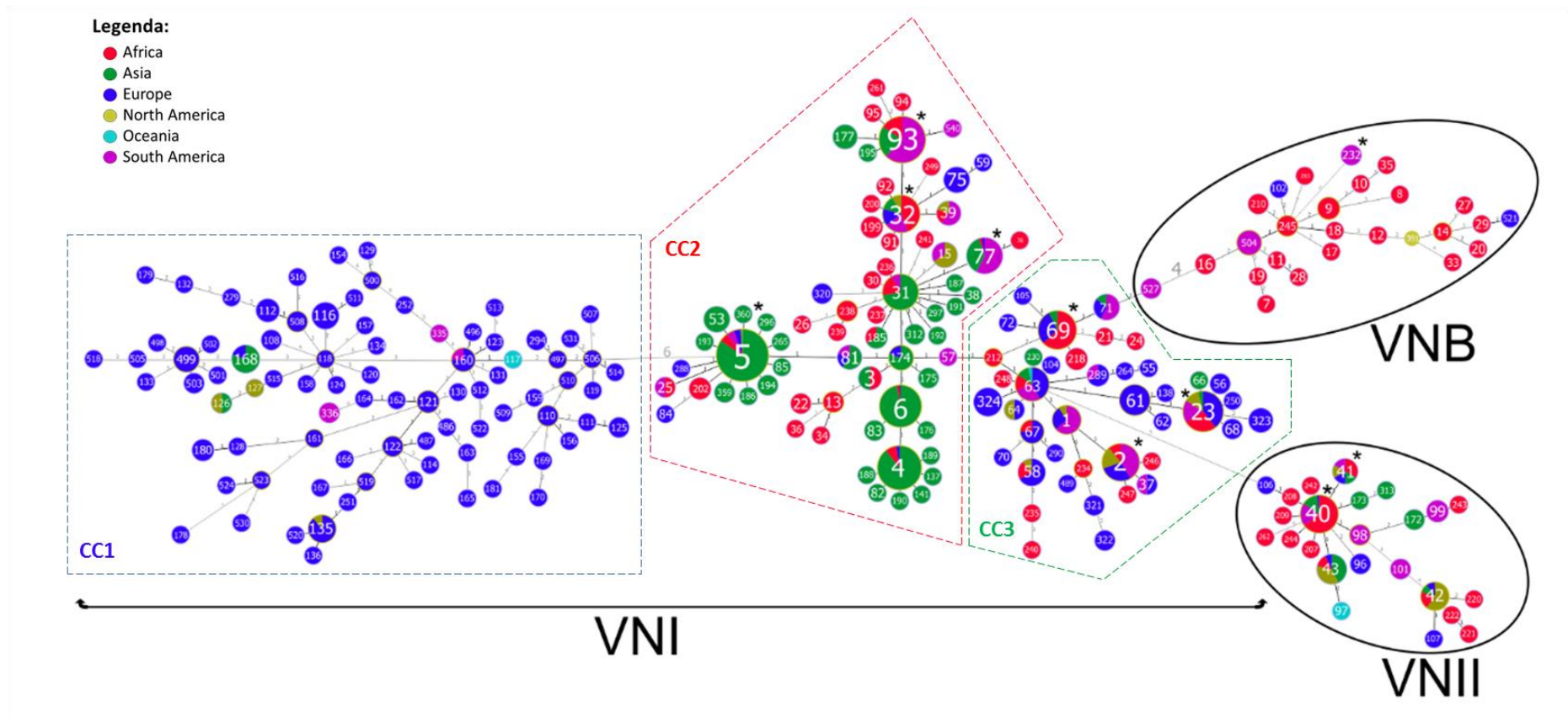
A árvore de abrangência mínima (*Minimum Spanning Tree*) pelo algoritmo *goeBURST* (Figura 6) agrupou os genótipos ST40 e ST41 no grupo do tipo molecular VNII e, o genótipo ST232 no grupo do tipo molecular VNB (Figura 7). Na mesma análise, os STs globais do tipo molecular VNI foram agrupados de acordo com seu continente de origem: o primeiro complexo clonal (CC1) em que predominaram os STs europeus, o segundo complexo clonal (CC2) em que predominaram os STs asiáticos e africanos e um terceiro complexo clonal (CC3), mais heterogêneo, onde não há predomínio específico de um continente (Figura 6). Os genótipos ST5, ST32, ST77 e ST93 foram agrupados no CC2 do tipo molecular VNI, enquanto os STs ST2, ST23 e ST63 foram agrupados no CC3 do mesmo tipo molecular (Figura 8).

Figura 5 - Árvore de abrangência mínima (*Minimum Spanning Tree*) pelo algoritmo *goeBURST*, software PHYLOViZ, feita com os dez STs identificados no presente estudo, representando a distribuição de acordo com a região brasileira de origem (A) e com o tipo de isolamento, clínico ou ambiental (B). Os números no centro de cada círculo identificam o ST e as subdivisões indicam a porcentagem de cepas por categoria de interesse (região de origem ou tipo de isolamento), representadas por uma cor específica. Podem ser observados três grupos principais, relacionados aos tipos moleculares VNI, VNII e VNB.



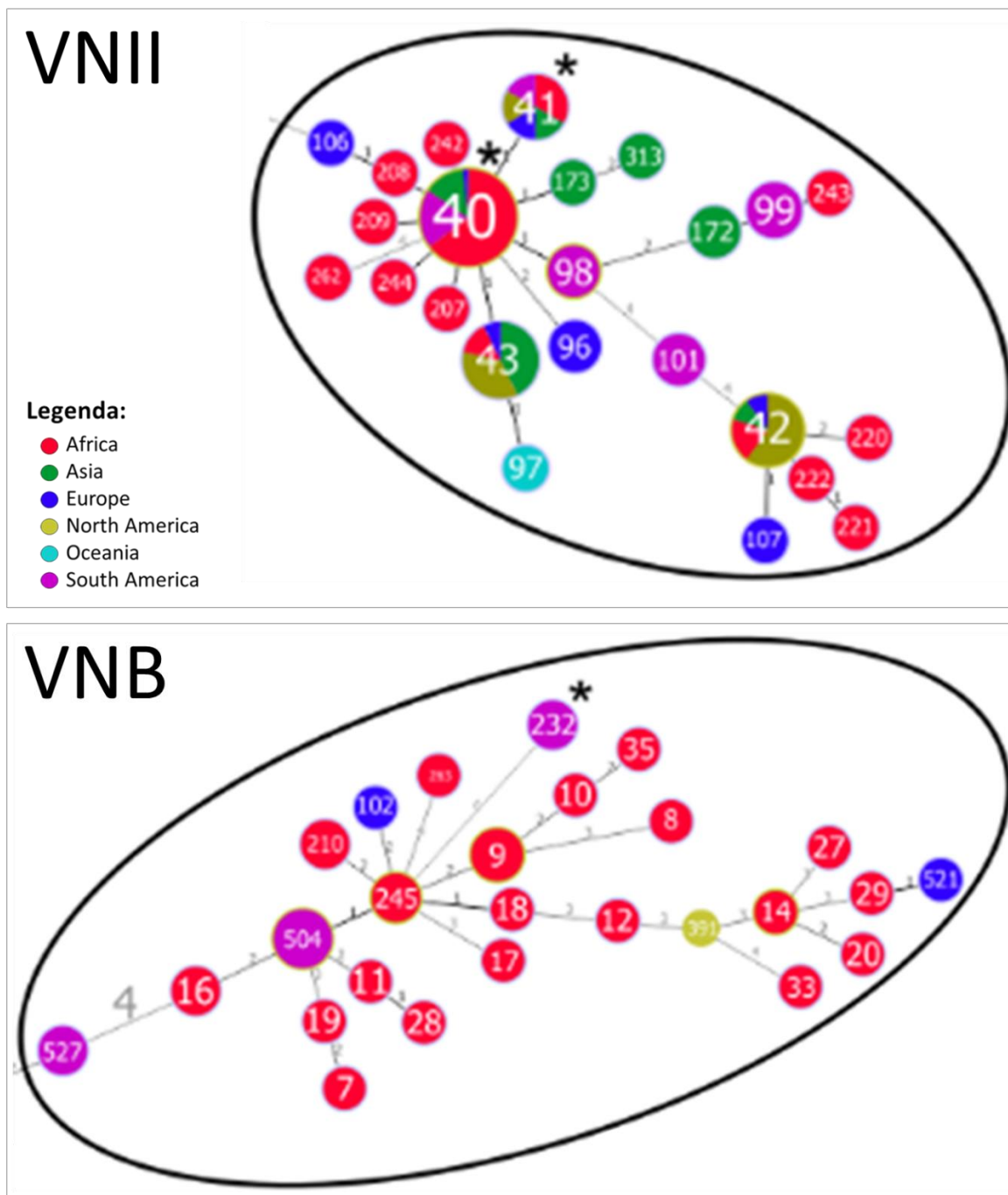
Fonte: Elaboração própria.

Figura 6 - Árvore de abrangência mínima (*Minimum Spanning Tree*) pelo algoritmo *goeBURST*, software *PHYLOViZ*, feita com os STs identificados no presente estudo (indicados por asterisco) somados aos dados previamente publicados em todo o mundo, representando a diversidade observada nos isolados globais e sua distribuição de acordo com o continente de origem. Os números no centro de cada círculo identificam o ST e as subdivisões indicam a porcentagem de cepas por continente, representados por uma cor específica. Podem ser observados três grupos principais, relacionados aos tipos moleculares VNI, VNII e VNB, além dos subgrupos CC1, CC2 e CC3 do tipo molecular VNI.



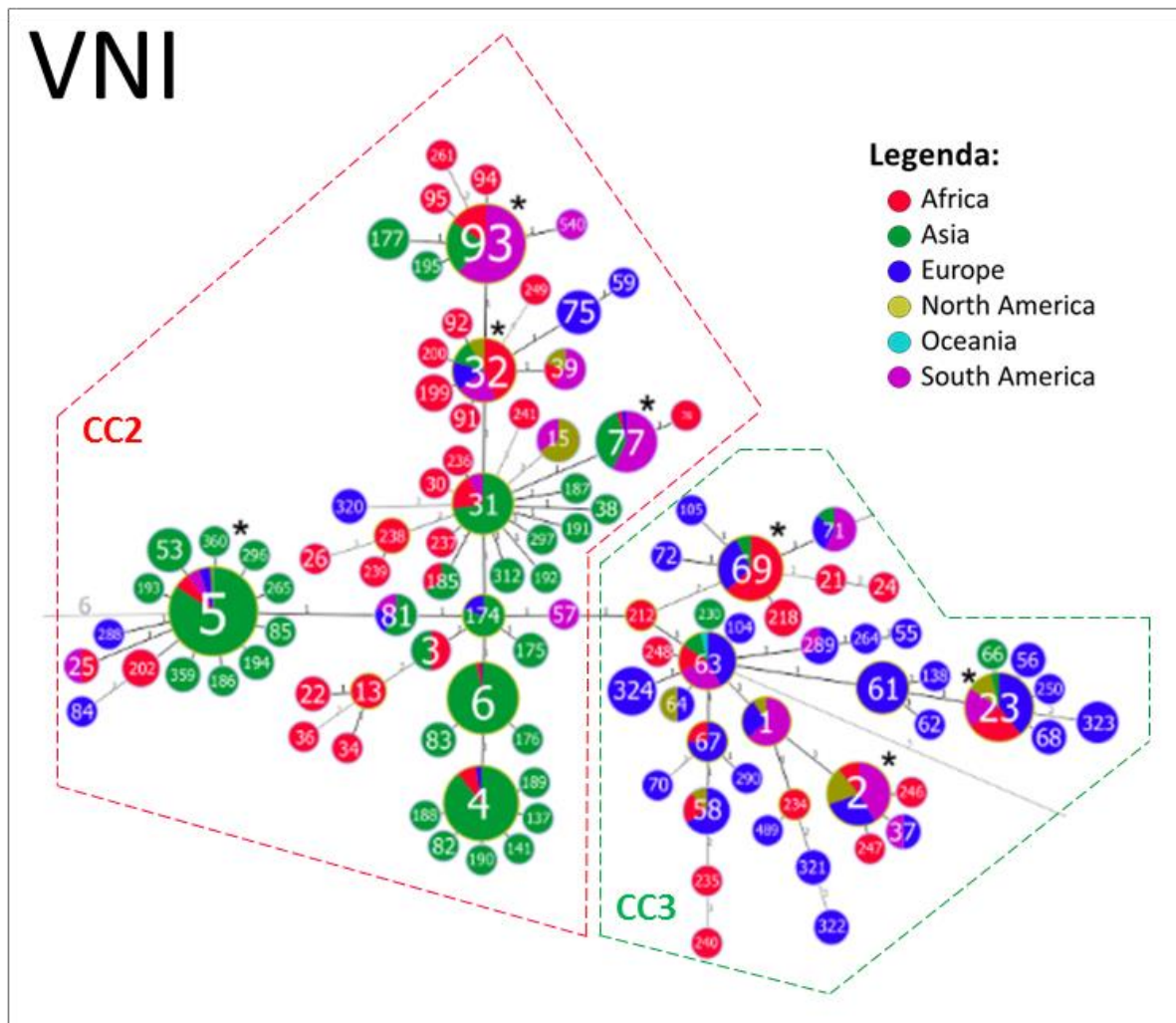
Fonte: Elaboração própria.

Figura 7 – Segmentos da árvore de abrangência mínima (*Minimum Spanning Tree*) pelo algoritmo *goeBURST*, software PHYLOViZ, destacando os grupos relacionados aos tipos moleculares VNII e VNB. Os STs identificados no presente estudo estão indicados por asterisco. No grupo do tipo molecular VNB estão o genótipo ST232, identificado no presente estudo, e os genótipos ST504 e ST527, anteriormente descritos na literatura como os primeiros isolados brasileiros de VNB.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 8 – Segmento da árvore de abrangência mínima (*Minimum Spanning Tree*) pelo algoritmo *goeBURST*, software PHYLOViZ, destacando os subgrupos CC2, composto por STs predominantemente asiáticos e africanos, e CC3, onde os STs não apresentam predomínio de um continente específico. Os STs identificados no presente estudo estão indicados por asterisco.



Fonte: Elaboração própria.



A análise da diversidade haplotípica dos 79 isolados estudados foi de 0,648, demonstrando clonalidade desta população de *C. neoformans*. Dentre os estados analisados, os com maior número de isolados são: Rio de Janeiro, que apresentou baixo Hd e o maior  $\pi$ ; Amazonas, que apresentou o menor Hd e também o menor  $\pi$ ; e Piauí, que apresentou o maior Hd, porém, um baixo  $\pi$ . O estado do Tocantins não teve Hd e  $\pi$  calculados (Tabela 2). Não foram identificados eventos de recombinação nos sete *loci* da população estudada.

Tabela 2 - Análise das diversidades haplotípica (Hd) e nucleotídica ( $\pi$ ), pelo software DnaSP v5.10.1, dos 79 isolados de *Cryptococcus neoformans*.

UF	Hd	$\pi$	Haplótipos	N
AM	0,356	0,00124	2	10
RJ	0,577	0,00567	6	41
DF	0,667	0,00250	2	3
RR	0,667	0,00226	3	7
PA	0,733	0,00223	3	6
PI	0,806	0,00228	5	9
MS	1,000	0,01227	2	2
TO	—	—	1	1
<b>Geral</b>	0,648	0,00443	10	79

**Legenda:**

UF - Unidade Federativa (Estado)

Hd - Haplotype Diversity (Diversidade Haplotípica)

$\pi$  - Nucleotide Diversity (Diversidade Nucleotídica)

N - Número de isolados

Fonte: Elaboração própria.

## 5 DISCUSSÃO

O MLST foi padronizado para a tipagem molecular dos complexos de espécies *C. neoformans* e *C. gattii* com o objetivo de cepas globais poderem ser comparadas com uma metodologia reprodutível, servindo como ferramenta de vigilância epidemiológica e para o monitoramento de possíveis cepas de maior virulência e/ou menor sensibilidade aos fármacos antifúngicos. Diversos trabalhos já foram publicados utilizando esta técnica e alguns autores sugerem que STs específicos podem estar relacionados a diferentes características clínico-epidemiológicas e perfis de virulência, como descrito a seguir.

A população do complexo *C. neoformans* estudada no presente trabalho é composta majoritariamente pelos tipos moleculares VNI e VNII, e demonstrou ser altamente clonal (com baixa diversidade haplotípica e nucleotídica) e sem recombinação genética. Estes resultados estão em consonância com a literatura, que, de modo geral, descreve que a população do complexo *C. neoformans* é altamente clonal em todo o mundo, com variações da distribuição de STs específicos de região para região (ANDRADE-SILVA *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2018; DOU *et al.*, 2015; FERREIRA-PAIM *et al.*, 2017; HATTHAKAROON *et al.*, 2017; KASSI *et al.*, 2019; KHAYHAN *et al.*, 2013; ROCHA *et al.*, 2018; SAMARASINGHE *et al.*, 2019; THANH *et al.*, 2018). Estudos recentes de genotipagem por MLST também evidenciaram a clonalidade de cepas brasileiras do complexo *C. neoformans* oriundos dos estados de Minas Gerais (ANDRADE-SILVA *et al.*, 2018; FERREIRA-PAIM *et al.*, 2017) e Amazonas (ROCHA *et al.*, 2018).

Todavia, a premissa de que o complexo *C. neoformans* é clonal em todo o mundo parece não se aplicar as regiões que apresentam uma maior distribuição dos tipos moleculares VNIV e VNB, a exemplo dos continentes europeu e africano. Em relação ao continente europeu, este apresenta uma alta diversidade genética do complexo *C. neoformans*, porém, é possível perceber diferenças em relação a diversidade dos tipos moleculares VNI e VNIV, sendo VNI mais clonal e prevalente que VNIV (COGLIATI *et al.*, 2013; 2019; DESNOS-OLLIVIER *et al.*, 2015; SANCHINI *et al.*, 2014). Além disso, a maioria dos STs europeus de ambos os tipos moleculares VNI e VNIV apresentaram uma distribuição geograficamente restrita a Europa, ou seja, parecem ser ausentes em outros continentes (COGLIATI *et al.*, 2019). Cogliati e col. (2016) já haviam relatado a existência de uma estrutura genética populacional não

clonal e recombinante em isolados do tipo molecular VNIV (*C. neoformans* var. *neoformans*), e, quando comparado aos tipos VNI e VNII (*C. neoformans* var. *grubii*) foi possível perceber que as duas variedades apresentavam estruturas populacionais diferentes. Em relação ao continente africano, especificamente na região sul deste continente, há uma maior diversidade genética do complexo *C. neoformans* que pode ser explicada pela recombinação genética verificada nesta região e/ou pela origem ancestral das linhagens ambientais do tipo molecular VNB, já que o estresse ambiental parece ser mais eficiente para a geração de novos genótipos do que o estresse provocado em parasitismo (LITVINTSEVA, 2005; LITVINTSEVA *et al.*, 2011; LITVINTSEVA; MITCHELL, 2012).

No presente estudo, a regionalidade dos STs ficou evidente por meio da análise alélica dos isolados utilizando o algoritmo *goeBURST* (Figura 5). Foi possível demonstrar que os isolados do tipo molecular VNI oriundos do continente europeu, em sua maioria, apresentam STs possivelmente restritos geograficamente a este continente, que se agrupam em um cluster único (CC1), corroborando com os resultados de Cogliati e col. (2019), citados anteriormente. De forma semelhante, os isolados do continente africano são encontrados predominantemente em um dos subgrupos do tipo molecular VNI (CC2) e no grupo do tipo molecular VNB. Foi possível ainda notar a maior diversidade de ambos os isolados europeus e africanos. Em relação aos isolados brasileiros do presente estudo, a alta clonalidade reflete o pequeno número de STs encontrados nesta população, em sua maioria inseridos nos grupos CC2 e CC3, este último subgrupo sendo mais cosmopolita em relação aos outros (não há domínio de um continente específico).

Em relação a determinação do tipo sexual dos isolados do presente estudo, a grande maioria é do tipo sexual MAT-alpha. Resultados semelhantes foram obtidos por Ferreira-Paim e col. (2017) e por Andrade-Silva e col. (2018), onde as cepas brasileiras do complexo *C. neoformans* estudadas apresentaram uma proporção de 91% e 100%, respectivamente, para o tipo sexual MAT-alpha. Este achado corrobora com a literatura, que diz que o tipo sexual MAT-alpha é o mais comum na natureza, e, por isso, a grande maioria dos isolados clínicos do complexo *C. neoformans* são deste tipo sexual (LITVINTSEVA *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2008; KWON-CHUNG *et al.*, 2014). As causas que levam a escassez de cepas do tipo sexual MAT-a ainda não foram esclarecidas (KWON-CHUNG *et al.*, 2014). Ao obter resultado semelhante, Andrade-Silva e col. (2018) concluíram que a hegemonia do tipo sexual MAT-alpha

sobre a população do complexo *C. neoformans* pode ser reflexo da alta clonalidade observada nestes isolados, assim como pela forma de reprodução unissexual, ou seja, entre indivíduos do mesmo tipo sexual MAT-alpha. Além disso, Chang e col. (2000) observaram que cepas do complexo *C. neoformans* do tipo sexual MAT-alpha apresentaram maior virulência que cepas do tipo sexual MAT-a em modelo murino, o que também poderia explicar a prevalência deste tipo sexual entre os isolados clínicos.

Apenas sete isolados do presente estudo foram identificados como tipo sexual MAT-alpha/a. Segundo a literatura, o quadro global predominante é que o ciclo sexuado alpha/a é incomum, geograficamente restrito ou ausente em natureza (HEITMAN *et al.*, 2014). Apesar da identificação de isolados do tipo sexual MAT-alpha/a, não foi observada recombinação nos sete *loci* estudados, que podem não ser suficientes para a detecção de recombinação. Todavia, no estudo de Souto e col. (2016), estes mesmos *loci* foram capazes de detectar recombinação em cepas do tipo molecular VGII do complexo *C. gattii* no Brasil, que, combinado a alta diversidade haplotípica observada, reforçou a teoria anteriormente descrita de que a origem do VGII pode ser a América do Sul. Outra explicação seria a possibilidade de tais linhagens serem diploides ou aneuploides que não completaram o ciclo clássico sexuado.

Em relação aos genótipos encontrados no presente trabalho, o ST93: é predominante entre os isolados brasileiros estudados (56,9%), está presente em todas as regiões brasileiras contempladas e é o principal genótipo do cluster 2 do tipo VNI na análise filogenética pelo algoritmo *Neighbor-Joining* (Figura 3). Este mesmo ST foi descrito como o mais prevalente nos estudos utilizando o MLST nos estados brasileiros de Minas Gerais (ANDRADE-SILVA *et al.*, 2018; FERREIRA-PAIM *et al.*, 2017) e Amazonas (ROCHA *et al.*, 2018), e, diante disso, pode-se influir que o ST93 é o ST mais prevalente no Brasil. Estes estudos também destacam a aparente associação deste genótipo a uma maior morbimortalidade da criptococose em indivíduos vivendo com HIV/aids nas regiões Sudeste e Norte do Brasil. Os dados globais de MLST encontrados na literatura e analisados no presente estudo pelo algoritmo *goeBURST* revelam que o ST93 está presente de forma considerável no continente sul-americano e em menor proporção nos continentes asiático e africano. Além de sua ampla distribuição, cepas ST93 também foram associadas à alta mortalidade em Uganda (FERREIRA-PAIM *et al.*, 2017) e a resistência aos

antifúngicos fluconazol, itraconazol, anfotericina B e alto MIC para fluorcitosina (ANDRADE-SILVA *et al.*, 2018; KHAYHAN *et al.*, 2013; SMITH *et al.*, 2015). Entretanto, Rocha e col. (2018) demonstraram de forma inédita a sensibilidade de cepas ST93 ao fluconazol, itraconazol e anfotericina B, revelando as diferenças fenotípicas que podem ser observadas entre cepas de um mesmo ST.

No presente trabalho, o ST40 foi o segundo genótipo mais prevalente entre os isolados brasileiros estudados (12,6%), representando de forma quase integral o grupo do tipo molecular VNII (além de uma única cepa ST41). Adicionalmente, todas as cepas do tipo molecular VNII (ST40 e ST41) foram recuperadas de isolamento clínico. Distribuição semelhante foi observada por Beale e col. (2015), onde o ST40 foi o mais prevalente dentre os 14 STs do tipo VNII recuperados de indivíduos sul-africanos com infecção pelo HIV. Pode-se perceber que a população de cepas sul-africanas do tipo VNII é expressivamente mais heterogênea que a população de cepas brasileiras deste mesmo tipo molecular, porém, em ambas o ST40 é o mais prevalente. Neste mesmo estudo, cepas ST40 apresentaram alta atividade da enzima lacase e uma boa sobrevivência no LCR. Acredita-se que a alta atividade de lacase pode ter uma relação significativa com a baixa depuração no LCR durante a meningite criptocócica, provavelmente pela ação protetora da melanina frente aos radicais tóxicos e aos fármacos antifúngicos, principalmente anfotericina B (SABIITI *et al.*, 2014).

Foi possível observar no presente estudo o domínio do ST40 em relação a distribuição mundial do tipo VNII ficou ainda mais evidente após as análises dos dados globais de MLST pelo algoritmo *goeBURST* (Figura 5), seguido pelos ST41, ST42 e ST43, sendo o ST40 expressivamente isolado nos continentes africano, sul-americano e asiático, e de forma significativamente mais rara no continente europeu. Curiosamente, os ST41, ST42 e ST43 têm uma parcela significativa de isolados norte-americanos, enquanto que o ST40 parece não ter nenhum isolamento neste continente, evidenciando mais uma vez as diferenças de distribuição entre os STs.

O terceiro genótipo mais prevalente entre os isolados estudados foi o ST5 (11,4%), principal ST do cluster 1 do tipo VNI (Figura 3). Curiosamente, o isolamento deste genótipo no Brasil é raro, sendo descrito na literatura em apenas quatro cepas brasileiras, sendo duas clínicas e duas ambientais, mais precisamente no estado de Minas Gerais (ANDRADE-SILVA *et al.*, 2018; FERREIRA-PAIM *et al.*, 2017). Entretanto, o ST5 foi recentemente descrito como o genótipo principal entre cepas

clínicas do complexo *C. neoformans* (n=115/159; 72.3%) obtidas em um estudo prospectivo com indivíduos vivendo com HIV/aids em Abidjan, Costa do Marfim (KASSI *et al.*, 2019), além de ser frequentemente descrito como o principal genótipo causador da criptococose por *C. neoformans* em diversos países do continente asiático, principalmente na China e no Japão (Ásia Oriental) (CHEN *et al.*, 2018; DOU *et al.*, 2015; KHAYHAN *et al.*, 2013; MIHARA *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2015). As análises dos dados globais de MLST pelo algoritmo *goeBURST* realizadas no presente estudo corroboram com a descrição da hegemonia do ST5 no continente asiático.

O ST5, juntamente com os genótipos ST4 e ST6, está inserido em um grupo consideravelmente clonal que é responsável pela maioria dos casos de criptococose nos países asiáticos, com algumas diferenças em relação a sua distribuição, de acordo com o país ou o tipo de hospedeiro. Ao que tudo indica, nos países asiáticos onde predomina a infecção por ST5 as infecções por ST4 e ST6 ficam em segundo plano, e o contrário também acontece. Por exemplo, países como a Tailândia e o Laos (sudeste asiático) têm como principais genótipos ST4 e ST6, e apenas alguns poucos casos de infecção por ST5, que costuma ocupar o terceiro lugar em prevalência (HATTHAKAROON *et al.*, 2017; KAOCHAROEN *et al.*, 2013; THANH *et al.*, 2018). No Vietnã (sudeste asiático), apesar de sua proximidade com a Tailândia e o Laos, o ST5 é também o mais prevalente (DAY *et al.*, 2017), mostrando que a distribuição dos STs é bastante complexa, e não se limita apenas a linhas geográficas.

Na Ásia, a clássica correlação entre a infecção por *C. neoformans* e o hospedeiro imunocomprometido (principalmente pessoas vivendo com HIV/aids) parece não ser tão comum, por motivos ainda desconhecidos. Alguns autores descrevem uma relação importante entre o ST5 e a infecção em indivíduos aparentemente hígidos neste continente, como pôde ser observado na China, Japão e Vietnã, onde o ST5 representa cerca de 68-88% dos isolados de indivíduos não infectados pelo HIV (DAY *et al.*, 2017; DOU *et al.*, 2015; KHAYHAN *et al.*, 2013; MIHARA *et al.*, 2013). Diante disso, Than e col. (2018) sugerem que é mais provável a criptococose por *C. neoformans* em pacientes não infectados pelo HIV nas regiões onde o ST5 está presente.

Acerca das diferenças epidemiológicas na Ásia, Day e col. (2017) supõem que a maior prevalência do ST5 se deve a duas prováveis causas: (1) a maior abundância deste ST no ambiente leva a uma maior exposição e oportunidade de infecção; (2)

este ST pode ter maior potencial patogênico em comparação aos outros, resultando em uma maior capacidade de causar infecção no hospedeiro humano.

Em relação a teoria de que existe maior quantidade deste genótipo no ambiente levando a maior oportunidade de infecção, vale ressaltar que todos os isolados de origem ambiental identificados neste estudo como ST5 são, sem exceção, oriundos da região amazônica, dos estados do Amazonas, Pará e Roraima. Isto pode representar um maior risco de exposição dos indivíduos desta região a um genótipo teoricamente capaz de causar infecção em indivíduos imunocompetentes. Apesar disso, Rocha e col. (2018) não identificaram o ST5 entre os 34 isolados clínicos do complexo *C. neoformans* oriundos do estado do Amazonas analisados em seu estudo. Isto pode ser explicado pelo fato do genótipo ST93 ser consideravelmente mais prevalente no estado do Amazonas, e, por isso, os casos de infecção por ST5 podem ser subestimados, requerendo uma maior investigação.

Ainda em relação a teoria de abundância deste genótipo no ambiente, Dou e col. (2017) observaram que o ST5 no continente asiático, apesar de predominante entre os isolados clínicos, é raramente recuperado de amostras ambientais. Em contrapartida, o ST31, genótipo de raro isolamento clínico, é bastante comum entre os isolados ambientais. Segundo os autores, esta diferença de distribuição em relação ao tipo de isolamento (clínico x ambiental) pode ser hipoteticamente explicada pela “interação ambiente-patógeno-hospedeiro”, seguindo três teorias principais: (1) a probabilidade de infecção é igual entre todos os genótipos de *C. neoformans*, e, portanto, existe uma exposição diferencial do hospedeiro em relação a fonte ambiental (com diferenças na distribuição ambiental dos genótipos); (2) a probabilidade de infecção pode variar de acordo com o genótipo, ou seja, existem diferenças de virulência entre os genótipos ambientais e clínicos; (3) um conjunto de fatores do hospedeiro resultam em uma prevalência diferencial entre os genótipos causadores da doença.

Dentre os outros STs de menor distribuição na população estudada, estão: ST23, genótipo mais comum entre os isolados europeus de *C. neoformans* VNI (22%), recuperado principalmente do ambiente e encontrado na Itália, Alemanha, Turquia e França (COGLIATI *et al.*, 2019); ST32, considerado de alta frequência na África do Sul e raramente isolado nos continentes sul-americano e asiático, relacionado a pior sobrevida após um ano de infecção em análise bivariada (a aparente associação não pôde ser explicada por parâmetros clínicos) (BEALE *et al.*, 2015); ST63, o segundo

genótipo mais prevalente entre isolados europeus, sendo o mais difundido do grupo de STs em expansão na Europa, presente em França, Alemanha, Itália, Grécia, Espanha e Turquia (COGLIATI *et al.*, 2019); e ST77, recuperado majoritariamente de amostras ambientais como excrementos de aves e detritos de árvores no estado brasileiro de Minas Gerais (ANDRADE-SILVA *et al.*, 2018; FERREIRA-PAIM *et al.*, 2017) e apresentando cepas com MIC elevado para flucitosina e resistência ao fluconazol (KHAYHAN *et al.*, 2013).

O genótipo ST232, do tipo molecular VNB, foi identificado no presente estudo em dois isolados clínicos de um mesmo indivíduo vivendo com HIV/aids no estado do Rio de Janeiro. De acordo com a literatura, a primeira descrição de uma cepa VNB brasileira foi feita por Ngamskulrunroj e col. (2009), cepa Hamden C3-1 (WM 1408), recuperada de excreta de pombos em Belo Horizonte, Minas Gerais. A segunda, e mais recente, descrição do tipo VNB no Brasil foi feita por Andrade-Silva e col. (2018), cepas A1, A34, A90, A93II e AK11 (ST504) e cepas A4 e A4M (ST527), recuperados de excreta de aves urbanas e de cativo, em Uberaba, também no estado brasileiro de Minas Gerais. Portanto, o presente estudo é o primeiro relato do isolamento do tipo molecular VNB no estado do Rio de Janeiro e o primeiro isolamento clínico deste tipo molecular no Brasil.

Analisando os dados, foi verificado que tanto as sequências do genótipo ST232 (do presente estudo) quanto as sequências dos genótipos ST504 e ST527, previamente descritas por Andrade-Silva e col. (2018), foram agrupadas às sequências das cepas de Botswana originalmente descritas como VNB, genótipos ST8, ST14 e ST16 (LITVINTSEVA, 2005; LITVINTSEVA *et al.*, 2003), em ambas as análises pelos algoritmos *Neighbor-Joining* (Figura 3) e *goeBURST* (Figura 5), dando maior credibilidade ao resultado da identificação.

O isolamento do tipo molecular VNB fora do continente africano é considerado raro, porém, não se sabe ao certo por qual motivo. Segundo Andrade-Silva e col. (2018), a proximidade genética entre os tipos moleculares VNI/VNII e o tipo molecular VNB corrobora com a hipótese de que a população de VNB pode estar subestimada, especialmente onde a técnica de RFLP do gene *URA5* é a única empregada na identificação dos tipos moleculares de *C. neoformans*, dado que cepas VNB podem ser erroneamente identificadas como VNI/VNII. O RFLP ainda é amplamente utilizado nos laboratórios em todo o mundo, especialmente pelo baixo custo e maior praticidade em relação aos métodos atuais baseados no sequenciamento de DNA.



O tipo molecular VNB chamou a atenção da comunidade científica pela alta variabilidade genética, por ser raramente encontrado fora do continente africano e por estar relacionado a um pior desfecho clínico (maior mortalidade após 10 semanas de infecção e maior probabilidade de desenvolver alterações do estado mental), em comparação com VNI e VNII, em estudo realizado na África do Sul (BEALE *et al.*, 2015). Além de Botswana, a linhagem VNB já foi isolada em: África do Sul, Ruanda, República Democrática do Congo (COGLIATI, 2013), Zâmbia (VANHOVE *et al.*, 2017), Itália (COGLIATI *et al.*, 2018), Colômbia e Brasil (NGAMSKULRUNGROJ *et al.*, 2009).

O isolamento do tipo molecular VNB enfatiza a necessidade da vigilância epidemiológica dos agentes da criptococose no Brasil para apoiar ações estratégicas que favoreçam as tomadas de decisão na saúde e, com isso, diminuir a alta letalidade da criptococose no país.

ST5, ST23, ST77 e ST93 estavam presentes em ambos os tipos de isolamento, clínico e ambiental. Entretanto, ST2, ST32, ST40, ST41, ST63 e ST232 foram identificados apenas em isolados clínicos. Logo, STs frequentemente identificados em amostras clínicas, mas que não apresentam frequência significativa em isolamento ambiental, podem apresentar maior grau de patogenicidade. Alternativamente, esta diferença na distribuição dos STs em relação a fontes clínica e ambiental pode estar relacionada a fontes ambientais ainda inexploradas. Diferenças na distribuição dos STs em relação a fonte, clínica ou ambiental, já foram observadas em diversos continentes (ANDRADE-SILVA *et al.*, 2018; COGLIATI *et al.*, 2016, 2019; FERREIRA-PAIM *et al.*, 2017; KHAYHAN *et al.*, 2013; MONTAGNA *et al.*, 2018).

Como já foi mostrado, alguns estudos indicam que determinados genótipos do complexo *C. neoformans* podem estar de alguma forma relacionados a características como patogenicidade, virulência, variantes morfológicas, desfecho e parâmetros clínicos da criptococose. Entretanto, nem sempre estas relações ou as circunstâncias em que acontecem podem ser observadas, como descrito a seguir.

Fernandes e col. (2018) avaliaram se a capacidade das cepas de produzir variantes morfológicas (como o aumento/liberação da cápsula, células gigantes e microcélulas) estava associada a patogênese e manifestações clínicas da criptococose, e concluíram que a plasticidade é intensa e desempenha um importante papel na doença, porém, não está relacionada à diversidade genética, visto que

significativas diferenças fenotípicas ocorreram tanto entre diferentes genótipos de *C. neoformans* quanto entre estirpes de um mesmo genótipo.

Trevijano-Contador e col. (2018) demonstraram que em *C. neoformans* ambos sorotipo e tipo sexual não estão correlacionados com a formação de células do tipo titã, células gigantes de leveduras, visto que cepas de um mesmo sorotipo apresentaram alta e baixa capacidade de produzir este fenótipo.

Velez e col. (2018) observaram que a patogenicidade in vivo de cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* em modelo animal (*Galleria mellonella*) foi independente do genótipo, porém, ainda que dentro de um mesmo genótipo, há diferentes graus de patogenicidade. Segundo os autores, embora a caracterização molecular seja uma ótima ferramenta taxonômica, o método não mostra agrupamentos ou associações significativas que permitam distinguir cepas mais ou menos virulentas, seja de origem clínica ou ambiental.

Mukaremera e col. (2019) analisaram fatores determinantes do desfecho da criptococose em indivíduos vivendo com HIV/aids, utilizando cepas *C. neoformans* de um mesmo genótipo. Os autores concluíram que hospedeiros humanos infectados com cepas de um mesmo genótipo podem ter desfechos clínicos diferentes e, assim sendo, a associação de um ST com parâmetros clínicos vai depender da composição da coorte estudada, além de diferentes regiões do mundo poderem ter STs com diferentes proporções de cepas de alta e baixa virulência.

Ao que parece, há uma alta variabilidade de virulência nas cepas dos complexos de espécies, não apenas entre isolados diferentes, mas também entre células de uma mesma estirpe, demonstrando que a virulência pode ser influenciada por diversos fatores além do genótipo (VELEZ *et al.*, 2018).

Mais estudos devem ser realizados, utilizando um maior número de isolados, tanto clínicos quanto ambientais, e técnicas que possam gerar dados comparáveis entre os diferentes grupos de pesquisa em todo o mundo. Além disso, parece ser de extrema importância que os dados clínicos e eco-epidemiológicos dos indivíduos e dos materiais do isolamento das cepas estejam disponíveis para a correlação com os dados obtidos de forma experimental, objetivando um maior poder de observação dos fatos e uma melhor compreensão acerca dos mesmos.

## 6 CONCLUSÕES

A estrutura populacional das cepas de *C. neoformans* das quatro regiões brasileiras estudadas é composta por dez STs distintos, e se mostrou altamente clonal e sem recombinação genética.

Este é o primeiro relato do isolamento do tipo molecular VNB no estado do Rio de Janeiro, sendo também o primeiro relato de seu isolamento clínico no Brasil.

Os STs identificados com maior frequência em amostras ambientais são diferentes daqueles identificados com maior frequência em amostras clínicas, indicando que os ST's podem apresentar diferentes graus de patogenicidade.

STs específicos estão correlacionados a determinadas regiões geográficas, visto que diferentes populações genéticas do complexo *C. neoformans* são encontradas em determinados continentes e países, ao passo que alguns genótipos parecem ser mais cosmopolitas.

STs descritos na literatura como mais virulentos e/ou resistentes a antifúngicos circulam no Brasil, justificando a necessidade da continuação dos estudos acerca da criptococose, no Brasil e no mundo, o que poderá esclarecer com mais segurança quais genótipos devem ser monitorados para a possível adoção de medidas de prevenção e controle.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERG, J. A. et al. A pilot study of the discontinuation of antifungal therapy for disseminated cryptococcal disease in patients with acquired immunodeficiency syndrome, following immunologic response to antiretroviral therapy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 8, p. 1179–1182, 15 abr. 2002.

AGUIAR, P. A. D. F. DE et al. The epidemiology of cryptococcosis and the characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated in a Brazilian University Hospital. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 59, p. e13, 13 abr. 2017.

ALMEIDA, F.; LACAZ, C. S. Micose pelo *Cryptococcus neoformans*. **Primeiro caso observado em São Paulo. An. Paul. Med. Cir.(São Paulo)**, v. 42, p. 385–394, 1941.

ALMEIDA, F.; LACAZ, C. S.; SALLES, F. Blastomicose do tipo Busse-Buschke (granulomatose criptocócica, torula infection, torulosis). Segundo caso observado em São Paulo. **An. FaC. Med. Univ. São Paulo**, v. 20, p. 115, 1944.

ANDERSON, D. A.; CROWE, S. M.; GARCIA, M. Point-of-care testing. **Current HIV/aids reports**, v. 8, n. 1, p. 31–37, mar. 2011.

ANDERSON, T. M. et al. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. **Nature Chemical Biology**, v. 10, n. 5, p. 400–406, maio 2014.

ANDRADE-SILVA, L. E. et al. Genotypic analysis of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates from Brazil reveals the presence of VNB isolates and a correlation with biological factors. **PLOS ONE**, v. 13, n. 3, p. e0193237, 5 mar. 2018.

ANTACHOPOULOS, C.; WALSH, T. J. Immunotherapy of *Cryptococcus* infections. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 18, n. 2, p. 126–133, fev. 2012.

ANTINORI, S. et al. The role of cryptococcal antigen assay in diagnosis and monitoring of cryptococcal meningitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5828–5829, nov. 2005.

ANZAI, M. C. et al. *Cryptococcus gattii* VGII in a *Plathymentia reticulata* hollow in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Mycoses**, v. 57, n. 7, p. 414–418, jul. 2014.

BACKES, P. et al. Diagnóstico laboratorial de Cryptococcus sp. no líquido - Laboratory diagnosis of Cryptococcus sp. in cerebrospinal fluid. **RBAC - Suplemento Especial de Microbiologia e Micologia**, v. 48, n. 3 supl 1, p. 10–4, 2016.

BADDLEY, J. W. et al. Transmission of Cryptococcus neoformans by Organ Transplantation. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 52, n. 4, p. e94-98, 15 fev. 2011.

BARCHIESI, F. et al. Comparative analysis of pathogenicity of Cryptococcus neoformans serotypes A, D and AD in murine cryptococcosis. **The Journal of Infection**, v. 51, n. 1, p. 10–16, jul. 2005.

BEALE, M. A. et al. Genotypic Diversity Is Associated with Clinical Outcome and Phenotype in Cryptococcal Meningitis across Southern Africa. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 6, p. e0003847, 25 jun. 2015.

BELENKY, P.; CAMACHO, D.; COLLINS, J. J. Fungicidal drugs induce a common oxidative-damage cellular death pathway. **Cell Reports**, v. 3, n. 2, p. 350–358, 21 fev. 2013.

BENHAM, R. W. Cryptococcosis and blastomycosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 50, n. 10, p. 1299–1314, set. 1950.

BERNAL-MARTINEZ, L. et al. Susceptibility profile of clinical isolates of non-Cryptococcus neoformans/non-Cryptococcus gattii Cryptococcus species and literature review. **Medical Mycology**, v. 48, n. 1, p. 90–96, fev. 2010.

BICANIC, T. et al. Fungal burden, early fungicidal activity, and outcome in cryptococcal meningitis in antiretroviral-naive or antiretroviral-experienced patients treated with amphotericin B or fluconazole. **Clinical infectious diseases**, v. 45, n. 1, p. 76–80, 2007.

BICANIC, T. et al. Symptomatic relapse of HIV-associated cryptococcal meningitis after initial fluconazole monotherapy: the role of fluconazole resistance and immune reconstitution. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 43, n. 8, p. 1069–1073, 15 out. 2006.

BICANIC, T. et al. Toxicity of Amphotericin B Deoxycholate-Based Induction Therapy in Patients with HIV-Associated Cryptococcal Meningitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7224–7231, dez. 2015.

BICANIC, T.; HARRISON, T. S. Cryptococcal meningitis. **British Medical Bulletin**, v. 72, p. 99–118, 2004.

BILLMYRE, R. B. et al. Highly recombinant VGII *Cryptococcus gattii* population develops clonal outbreak clusters through both sexual macroevolution and asexual microevolution. **mBio**, v. 5, n. 4, p. e01494- 01414, 29 jul. 2014.

BOEKHOUT, T. et al. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology (Reading, England)**, v. 147, n. Pt 4, p. 891–907, abr. 2001.

BOVERS, M. et al. Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **FEMS yeast research**, v. 6, n. 4, p. 599–607, jun. 2006.

BRATTON, E. W. et al. Comparison and temporal trends of three groups with cryptococcosis: HIV-infected, solid organ transplant, and HIV-negative/non-transplant. **PloS One**, v. 7, n. 8, p. e43582, 2012.

BRITO-SANTOS, F. et al. Environmental isolation of *Cryptococcus gattii* VGII from indoor dust from typical wooden houses in the deep Amazonas of the Rio Negro basin. **PloS One**, v. 10, n. 2, p. e0115866, 2015.

BRITO-SANTOS, F. et al. Preheating of urine improves the specificity of urinary cryptococcal antigen testing using the lateral flow assay. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 5, 11 maio 2017.

BRIZENDINE, K. D.; BADDLEY, J. W.; PAPPAS, P. G. Pulmonary cryptococcosis. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 32, n. 6, p. 727–734, dez. 2011.

BROUWER, A. E. et al. Baseline correlation and comparative kinetics of cerebrospinal fluid colony-forming unit counts and antigen titers in cryptococcal meningitis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, n. 4, p. 681–684, 15 ago. 2005.

BROUWER, A. E. et al. Combination antifungal therapies for HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomised trial. **Lancet (London, England)**, v. 363, n. 9423, p. 1764–1767, 29 maio 2004.

BULMER, G. S.; SANS, M. D. *Cryptococcus neoformans*. II. Phagocytosis by human leukocytes. **Journal of Bacteriology**, v. 94, n. 5, p. 1480–1483, nov. 1967.

BULMER, G. S.; SANS, M. D.; GUNN, C. M. *Cryptococcus neoformans*. I. Nonencapsulated mutants. **Journal of Bacteriology**, v. 94, n. 5, p. 1475–1479, nov. 1967.

BUSSE, O. Über parasitäre Zelleinschlüsse und ihre Züchtung [About parasitic cell inclusions and their breeding]. **Zentralbl Bakteriol**, v. 16, p. 175–180, 1894.

BUSSE, O. Ueber saccharomycosis hominis [About saccharomycosis hominis]. **Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin**, v. 140, n. 1, p. 23–46, 1895.

BYRNES, E. J. et al. Molecular evidence that the range of the Vancouver Island outbreak of *Cryptococcus gattii* infection has expanded into the Pacific Northwest in the United States. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 7, p. 1081–1086, 1 abr. 2009.

CAMPOS, F. L.; BARONI, F. D. A. Isolados de *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii* produtores de protease e fosfolipase. **Revista de Patologia Tropical**, v. 39, n. 2, 4 ago. 2010.

CASTILLO, J. A. L. Infection due to HIV/aids in the current world. **MediSan**, v. 18, n. 07, p. 117–138, 2014.

CASTRO-JIMÉNEZ, M. Á. et al. Diagnosis of fungal opportunistic infections in HIV/aids patients: A cases study in Colombia. **Infectio**, v. 15, n. 2, p. 92–97, 2011.

CHANG, Y. C. et al. *Cryptococcus neoformans* STE12alpha regulates virulence but is not essential for mating. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 191, n. 5, p. 871–882, mar. 2000.

CHEN, J. et al. *Cryptococcus neoformans* strains and infection in apparently immunocompetent patients, China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, p. 755–762, maio 2008.

CHEN, K. Y. et al. Pulmonary fungal infection: emphasis on microbiological spectra, patient outcome, and prognostic factors. **Chest**, v. 120, n. 1, p. 177–184, jul. 2001.

CHEN, Y.-H. et al. Multi-Locus Sequence Typing Reveals both Shared and Unique Genotypes of *Cryptococcus neoformans* in Jiangxi Province, China. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1495, 24 jan. 2018.

COGLIATI, M. et al. Epidemiological trends of cryptococcosis in Italy: Molecular typing and susceptibility pattern of *Cryptococcus neoformans* isolates collected during a 20-year period. **Medical Mycology**, Vol. 0, n. 0, p. 1-9, jan. 2018.

COGLIATI, M. et al. Genotypes and population genetics of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* species complexes in Europe and the

mediterranean area. **Fungal genetics and biology: FG & B**, v. 129, p. 16–29, 3 abr. 2019.

COGLIATI, M. et al. Heterozygosity and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* AD-hybrid isolates. **Mycopathologia**, v. 173, n. 5–6, p. 347–357, jun. 2012.

COGLIATI, M. et al. Molecular epidemiology of Italian clinical *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* isolates. **Medical Mycology**, v. 51, n. 5, p. 499–506, jul. 2013.

COGLIATI, M. et al. Multilocus sequence typing analysis reveals that *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* is a recombinant population. **Fungal Genetics and Biology**, v. 87, p. 22–29, fev. 2016.

COLLINS, H. L.; BANCROFT, G. J. Cytokine enhancement of complement-dependent phagocytosis by macrophages: synergy of tumor necrosis factor- $\alpha$  and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. **European Journal of Immunology**, v. 22, n. 6, p. 1447–1454, jun. 1992.

CURTIS, F. Contribution a l'étude de la saccharomycose humaine [Contribution to the study of human saccharomycosis]. **Ann. Inst. Pasteur**, v. 10, p. 449–468, 1896.

DATTA, K.; BARTLETT, K. H.; MARR, K. A. *Cryptococcus gattii*: Emergence in Western North America: Exploitation of a Novel Ecological Niche. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2009, p. 176532, 2009.

DAVEL, G.; CANTEROS, C. E. Situación de las micosis en la República Argentina. **Revista argentina de microbiología**, v. 39, n. 1, p. 28–33, 2007.

DAY, J. N. et al. Combination antifungal therapy for cryptococcal meningitis. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 14, p. 1291–1302, 2013.

DAY, J. N. et al. Comparative genomics of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* associated with meningitis in HIV infected and uninfected patients in Vietnam. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 6, p. e0005628, jun. 2017.

DESNOS-OLLIVIER, M. et al. *Cryptococcus* Serotypes Impact Outcome and Provide Evidence of *Cryptococcus neoformans* Speciation. **mBio**, v. 6, n. 3, p. e00311, 9 jun. 2015.

DIAZ, M. R. et al. Molecular sequence analyses of the intergenic spacer (IGS) associated with rDNA of the two varieties of the pathogenic yeast, *Cryptococcus neoformans*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 535–545, dez. 2000.



DOU, H. et al. Molecular characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from the environment in Beijing, China. **Medical mycology**, v. 55, n. 7, p. 737–747, 1 out. 2017.

DOU, H.-T. et al. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in China between 2007 and 2013 using Multi-Locus Sequence Typing and the DiversiLab system. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 753–762, abr. 2015.

DROMER, F. et al. Major role for amphotericin B-flucytosine combination in severe cryptococcosis. **PloS One**, v. 3, n. 8, p. e2870, 6 ago. 2008.

ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **J Clin Microbiol**, 28: 1642–1644. 1990.

EMMONS, C. W. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. **J Bacteriol**, 62: 685–690. 1951.

EMMONS, C. W. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). **Am J Hyg**, 62: 227–232. 1955.

ENGELTHALER, D. M. et al. *Cryptococcus gattii* in North American Pacific Northwest: Whole-Population Genome Analysis Provides Insights into Species Evolution and Dispersal. **mBio**, v. 5, n. 4, p. e01464-14-e01464-14, 15 jul. 2014.

EVANS, E. E. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. I. A serologic classification by means of the capsular and agglutination reactions. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 64, n. 5, p. 423–430, maio 1950.

EVANS, E. E.; KESSEL, J. F. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. II. Serologic studies with the capsular polysaccharide. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 67, n. 2, p. 109–114, ago. 1951.

FARRER, R. A. et al. A New Lineage of *Cryptococcus gattii* (VGV) Discovered in the Central Zambezan Miombo Woodlands. **mBio**, v. 10, n. 6, 12 2019.

FERNANDES, K. E. et al. Phenotypic Variability Correlates with Clinical Outcome in *Cryptococcus* Isolates Obtained from Botswanan HIV/aids Patients. **mBio**, v. 9, n. 5, 23 2018.

FERREIRA-PAIM, K. et al. MLST-Based Population Genetic Analysis in a Global Context Reveals Clonality amongst *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI Isolates from HIV Patients in Southeastern Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, p. e0005223, 18 jan. 2017.

FERRER, C. et al. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 8, p. 2873–2879, ago. 2001.

FINDLEY, K. et al. Phylogeny and phenotypic characterization of pathogenic *Cryptococcus* species and closely related saprobic taxa in the Tremellales. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 3, p. 353–361, mar. 2009.

FIRACATIVE, C. et al. The status of cryptococcosis in Latin America. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, p. e170554, 2018.

FIRACATIVE, C.; TRILLES, L.; MEYER, W. MALDI-TOF MS enables the rapid identification of the major molecular types within the *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex. **PloS One**, v. 7, n. 5, p. e37566, 2012.

FONSECA, F. L. et al. Role for chitin and chitooligomers in the capsular architecture of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 10, p. 1543–1553, out. 2009.

FRANCISCO, A. P. et al. PHYLOViZ: phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods. **BMC bioinformatics**, v. 13, p. 87, 8 maio 2012.

FRANZOT, S. P.; SALKIN, I. F.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 838–840, mar. 1999.

FRASER, J. A. et al. Recapitulation of the sexual cycle of the primary fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: implications for an outbreak on Vancouver Island, Canada. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 5, p. 1036–1045, out. 2003.

FRASER, J. A. et al. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. **Nature**, v. 437, n. 7063, p. 1360–1364, 27 out. 2005.

GALANIS, E. et al. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999–2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 251–257, fev. 2010.

GAONA-FLORES, V. A. et al. The epidemiology of fungemia in an infectious diseases hospital in Mexico city: A 10-year retrospective review. **Sabouraudia**, v. 54, n. 6, p. 600–604, 2016.

GAZZONI, A. F. et al. Histopathology, serology and cultures in the diagnosis of cryptococcosis. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 51, n. 5, p. 255–259, out. 2009.

GRAF, B. et al. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of yeasts and yeast-like organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 1782–1785, maio 2000.

GRINSELL, M. et al. In vivo clearance of glucuronoxylomannan, the major capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans*: a critical role for tissue macrophages. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, n. 4, p. 479–487, 15 ago. 2001.

HAGEN, F. et al. Ancient dispersal of the human fungal pathogen *Cryptococcus gattii* from the Amazon rainforest. **PloS One**, v. 8, n. 8, p. e71148, 2013.

HAGEN, F. et al. Autochthonous and dormant *Cryptococcus gattii* infections in Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 10, p. 1618–1624, out. 2012b.

HAGEN, F. et al. Extensive genetic diversity within the Dutch clinical *Cryptococcus neoformans* population. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 1918–1926, jun. 2012a.

HAGEN, F. et al. Importance of Resolving Fungal Nomenclature: the Case of Multiple Pathogenic Species in the *Cryptococcus* Genus. **mSphere**, v. 2, n. 4, ago. 2017.

HAGEN, F. et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal genetics and biology: FG & B**, v. 78, p. 16–48, maio 2015.

HALLIDAY, C. L. et al. Presence of  $\alpha$  and  $\alpha$  mating types in environmental and clinical collections of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* strains from Australia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 9, p. 2920-2926, 1999.

HANSEN, J. et al. Large-scale evaluation of the immuno-mycology lateral flow and enzyme-linked immunoassays for detection of cryptococcal antigen in serum and cerebrospinal fluid. **Clinical and vaccine immunology: CVI**, v. 20, n. 1, p. 52–55, jan. 2013.

HATTHAKAROON, C. et al. Molecular epidemiology of cryptococcal genotype VN1c/ST5 in Siriraj Hospital, Thailand. **PloS One**, v. 12, n. 3, p. e0173744, 2017.

HEITMAN, J. et al. Sexual reproduction of human fungal pathogens. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 8, 1 ago. 2014.

HUANG, H.-R. et al. Evaluation of a new cryptococcal antigen lateral flow immunoassay in serum, cerebrospinal fluid and urine for the diagnosis of

cryptococcosis: a meta-analysis and systematic review. **PloS One**, v. 10, n. 5, p. e0127117, 2015.

KABANDA, T. et al. Point-of-care diagnosis and prognostication of cryptococcal meningitis with the cryptococcal antigen lateral flow assay on cerebrospinal fluid. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 58, n. 1, p. 113–116, jan. 2014.

KAOCHAROEN, S. et al. Molecular epidemiology reveals genetic diversity amongst isolates of the *Cryptococcus neoformans*/C. *gattii* species complex in Thailand. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 7, p. e2297, 2013.

KARAOGLU, H. et al. Development of polymorphic microsatellite markers for *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 5, p. 1136–1138, set. 2008.

KASSI, F. K. et al. *Cryptococcus* genetic diversity and mixed infections in Ivorian HIV patients: A follow up study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 11, p. e0007812, nov. 2019.

KATSU, M. et al. The internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene show extensive diversity among isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **FEMS yeast research**, v. 4, n. 4–5, p. 377–388, jan. 2004.

KAWAKAMI, K. et al. Role of TNF-alpha in the induction of fungicidal activity of mouse peritoneal exudate cells against *Cryptococcus neoformans* by IL-12 and IL-18. **Cellular Immunology**, v. 193, n. 1, p. 9–16, 10 abr. 1999.

KELLY, S. L. et al. Resistance to amphotericin B associated with defective sterol delta 8-->7 isomerase in a *Cryptococcus neoformans* strain from an aids patient. **FEMS microbiology letters**, v. 122, n. 1–2, p. 39–42, 15 set. 1994.

KHAN, Z. U. et al. Carriage of *Cryptococcus neoformans* in the crops of pigeons. **Journal of Medical Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 215–218, maio 1978.

KHAYHAN, K. et al. Geographically structured populations of *Cryptococcus neoformans* Variety *grubii* in Asia correlate with HIV status and show a clonal population structure. **PloS One**, v. 8, n. 9, p. e72222, 2013.

KIDD, S. E. et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 49, p. 17258–17263, 7 dez. 2004.

KWON-CHUNG, K. J. A new genus, filobasidiella, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. **Mycologia**, v. 67, n. 6, p. 1197–1200, dez. 1975.

KWON-CHUNG, K. J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 7, p. a019760, 1 jul. 2014.

KWON-CHUNG, K. J. et al. The Case for Adopting the “Species Complex” Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **mSphere**, v. 2, n. 1, fev. 2017.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHECK, I.; BENNETT, J. E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 535–537, mar. 1982.

LACAZ, C. DA S. et al. **Tratado de micologia médica**. [s.l.] SciELO Brasil, 2002.

LAGROU, K. et al. Zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a magpie to an immunocompetent patient. **Journal of Internal Medicine**, v. 257, n. 4, p. 385–388, abr. 2005.

LANGFELDER, K. et al. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. **Fungal genetics and biology: FG & B**, v. 38, n. 2, p. 143–158, mar. 2003.

LARSEN, R. A. et al. Phase I evaluation of the safety and pharmacokinetics of murine-derived anticryptococcal antibody 18B7 in subjects with treated cryptococcal meningitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 3, p. 952–958, mar. 2005.

LATOUCHE, G. N. et al. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the phospholipase B (PLB1) gene for subtyping of *Cryptococcus neoformans* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 2080–2086, abr. 2003.

LAZÉRA, M. S. et al. Environmental Niches for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. In: KWON-CHUNG, K. J. et al. (Eds.). . **Cryptococcus**. [s.l.] American Society of Microbiology, 2011. p. 237–259.

LAZÉRA, M. S. et al. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Medical Mycology**, v. 38, n. 5, p. 379–383, out. 2000.

LEIMANN, B. C. Q.; KOIFMAN, R. J. Cryptococcal meningitis in Rio de Janeiro State, Brazil, 1994-2004. **Cadernos De Saude Publica**, v. 24, n. 11, p. 2582–2592, nov. 2008.

LI, Q. et al. Central nervous system cryptococcoma in immunocompetent patients: a short review illustrated by a new case. **Acta neurochirurgica**, v. 152, n. 1, p. 129–136, 2010.

LI, S. S.; MODY, C. H. Cryptococcus. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 7, n. 3, p. 186–196, maio 2010.

LIN, X. et al. alpha AD alpha hybrids of *Cryptococcus neoformans*: evidence of same-sex mating in nature and hybrid fitness. **PLoS genetics**, v. 3, n. 10, p. 1975–1990, out. 2007.

LIN, X.; HULL, C. M.; HEITMAN, J. Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*. **Nature**, v. 434, n. 7036, p. 1017–1021, 21 abr. 2005.

LITTMAN, M. L.; BOROK, R. Relation of the pigeon to cryptococcosis: natural carrier state, heat resistance and survival of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia Et Mycologia Applicata**, v. 35, n. 3, p. 329–345, 14 out. 1968.

LITVINTSEVA, A. P. et al. Evidence of sexual recombination among *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates in sub-Saharan Africa. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 6, p. 1162–1168, dez. 2003.

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

LITVINTSEVA, A. P. et al. Many globally isolated AD hybrid strains of *Cryptococcus neoformans* originated in Africa. **PLoS pathogens**, v. 3, n. 8, p. e114, 17 ago. 2007.

LITVINTSEVA, A. P. Multi-Locus Sequence Typing Reveals Three Genetic Subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (Serotype A), Including a Unique Population in Botswana. **Genetics**, v. 172, n. 4, p. 2223–2238, 15 dez. 2005.

LITVINTSEVA, A. P.; MITCHELL, T. G. Most environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A) are not lethal for mice. **Infection and immunity**, v. 77, n. 8, p. 3188–3195, 2009.

LITVINTSEVA, A. P.; MITCHELL, T. G. Population genetic analyses reveal the African origin and strain variation of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 2, p. e1002495, fev. 2012.

LIZARAZO, J. et al. [Results of nine years of the clinical and epidemiological survey on cryptococcosis in Colombia, 1997-2005]. **Biomedica: Revista Del Instituto Nacional De Salud**, v. 27, n. 1, p. 94–109, mar. 2007.

LOYSE, A. et al. Cryptococcal meningitis: improving access to essential antifungal medicines in resource-poor countries. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 13, n. 7, p. 629–637, jul. 2013.

MACDOUGALL, L. et al. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific Northwest, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 42–50, jan. 2007.

MALABONGA, V. M.; BASTI, J.; KAMHOLZ, S. L. Utility of bronchoscopic sampling techniques for cryptococcal disease in aids. **Chest**, v. 99, n. 2, p. 370–372, fev. 1991.

MASSONET, C. et al. Comparison of VITEK 2 with ITS2-fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 2209–2211, maio 2004.

MAY, R. C. et al. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 106–117, 2016.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 179–206, mar. 2016.

MCTAGGART, L. R. et al. Rapid identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 8, p. 3050–3053, ago. 2011.

MÉNDEZ-TOVAR, L. J. et al. Frequency of invasive fungal infections in a Mexican High-Specialty Hospital. Experience of 21 years. **Revista médica del Instituto Mexicano del Seguro Social**, v. 54, n. 5, p. 581, 2016.

MEYA, D. B. et al. Cost-Effectiveness of Serum Cryptococcal Antigen Screening to Prevent Deaths among HIV-Infected Persons with a CD4 + Cell Count  $\leq 100$  Cells/ $\mu$ L Who Start HIV Therapy in Resource-Limited Settings. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 4, p. 448–455, 15 ago. 2010.

MEYER, W. et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Medical Mycology**, v. 47, n. 6, p. 561–570, 2009.

MEYER, W. et al. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p. 189–195, fev. 2003.

MEYER, W.; TRILLES, L. Genotyping of the *Cryptococcus neoformans*/C. *gattii* species complex. **Australian Biochemist**, vol. 41, n. 1, p. 12-15, apr. 2010.

MIHARA, T. et al. Multi-Locus Sequence Typing of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV associated cryptococcosis in Nagasaki, Japan. **Medical Mycology**, v. 51, n. 3, p. 252–260, abr. 2013.

MILLER, W. T.; EDELMAN, J. M.; MILLER, W. T. Cryptococcal pulmonary infection in patients with aids: radiographic appearance. **Radiology**, v. 175, n. 3, p. 725–728, jun. 1990.

MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of aids--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 515–548, out. 1995.

MOLLOY, S. F. et al. Antifungal Combinations for Treatment of Cryptococcal Meningitis in Africa. **New England Journal of Medicine**, v. 378, n. 11, p. 1004–1017, 15 mar. 2018.

MONTAGNA, M. T. et al. Molecular characterization of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from environmental sources and genetic comparison with clinical isolates in Apulia, Italy. **Environmental Research**, v. 160, p. 347–352, 2018.

MORA, D. J. et al. Genotype and mating type distribution within clinical *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from patients with cryptococcal meningitis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Medical Mycology**, v. 48, n. 4, p. 561–569, jun. 2010.

MORETTI, M. L. et al. Guidelines in Cryptococcosis - 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 524–544, out. 2008.

MOURAD, A.; PERFECT, J. R. The war on cryptococcosis: A Review of the antifungal arsenal. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, p. e170391, 2018.

MUKAREMERA, L. et al. The Mouse Inhalation Model of *Cryptococcus neoformans* Infection Recapitulates Strain Virulence in Humans and Shows that



Closely Related Strains Can Possess Differential Virulence. **Infection and Immunity**, v. 87, n. 5, mar. 2019.

MUSSINI, C. et al. Discontinuation of maintenance therapy for cryptococcal meningitis in patients with aids treated with highly active antiretroviral therapy: an international observational study. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 38, n. 4, p. 565–571, 15 fev. 2004.

NGAMSKULRUNGROJ, P. et al. Genetic Diversity of the *Cryptococcus* Species Complex Suggests that *Cryptococcus gattii* Deserves to Have Varieties. **PLoS ONE**, v. 4, n. 6, p. e5862, 10 jun. 2009.

NI, M. et al. Unisexual and heterosexual meiotic reproduction generate aneuploidy and phenotypic diversity de novo in the yeast *Cryptococcus neoformans*. **PLoS biology**, v. 11, n. 9, p. e1001653, set. 2013.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 11, p. 3519–3528, nov. 2006.

NYAZIKA, T. K. et al. *Cryptococcus neoformans* population diversity and clinical outcomes of HIV-associated cryptococcal meningitis patients in Zimbabwe. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 1281–1288, nov. 2016.

OSTERHOLZER, J. J. et al. Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. **The American Journal of Pathology**, v. 174, n. 3, p. 932–943, mar. 2009.

PAPPALARDO, M. C. S. M.; MELHEM, M. S. C. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 45, n. 6, p. 299–305, dez. 2003.

PARK, B. J. et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/aids: **aids**, v. 23, n. 4, p. 525–530, fev. 2009.

PASSONI, L. F. et al. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: an analysis of the domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. **Medical Mycology**, v. 36, n. 5, p. 305–311, out. 1998.

PEDROSO, R. DOS S.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C. In vitro susceptibility to antifungal agents of environmental *Cryptococcus* spp. isolated in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 239–243, 2006.

PERFECT, J. R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america.

**Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 50, n. 3, p. 291–322, 1 fev. 2010.

PERFECT, J. R.; BICANIC, T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. **Fungal genetics and biology: FG & B**, v. 78, p. 49–54, maio 2015.

PERFECT, JR. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* ; 2015. In: **Mandell, Douglas, and Bennett's - Principles and practice of infectious diseases**. 8th. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2015. p. 2934–48.

PFALLER, M. A. et al. Multicenter evaluation of the new Vitek 2 yeast susceptibility test using new CLSI clinical breakpoints for fluconazole. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 2126–2130, jun. 2014.

PHILLIPS, P. et al. Longitudinal clinical findings and outcome among patients with *Cryptococcus gattii* infection in British Columbia. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 60, n. 9, p. 1368–1376, 1 maio 2015.

PINTO JUNIOR, V. L. et al. [Importance of culture of urine in the diagnosis of aids associated cryptococcosis]. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 39, n. 2, p. 230–232, abr. 2006.

PINTO JUNIOR, V. L. et al. *Cryptococcus gattii* molecular type VGII as agent of meningitis in a healthy child in Rio de Janeiro, Brazil: report of an autochthonous case. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p. 746–748, dez. 2010.

PITISUTTITHUM, P. et al. Activity of posaconazole in the treatment of central nervous system fungal infections. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 745–755, out. 2005.

POSTERARO, B. et al. Are the Conventional Commercial Yeast Identification Methods Still Helpful in the Era of New Clinical Microbiology Diagnostics? A Meta-Analysis of Their Accuracy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 8, p. 2439–2450, ago. 2015.

POSTERARO, B. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based method for discrimination between molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 7, p. 2472–2476, jul. 2012.

PRATTES, J. et al. Point of Care Testing for the Diagnosis of Fungal Infections: Are We There Yet? **Current Fungal Infection Reports**, v. 10, p. 43–50, 2016.

RAJASINGHAM, R. et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. 873–881, ago. 2017.

REVIÁKINA, V. et al. Diagnóstico inmunológico de las micosis sistémicas durante cinco años 2002-2006. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 27, n. 2, p. 112–119, 2007.

RHODES, J. et al. Tracing Genetic Exchange and Biogeography of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* at the Global Population Level. **Genetics**, v. 207, n. 1, p. 327–346, 2017.

ROBINSON, P. A. et al. Early mycological treatment failure in aids-associated cryptococcal meningitis. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 28, n. 1, p. 82–92, jan. 1999.

ROCHA, D. F. S. et al. MLST reveals a clonal population structure for *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI isolates from clinical sources in Amazonas, Northern-Brazil. **PloS One**, v. 13, n. 6, p. e0197841, 2018.

RUGEMALILA, J. et al. Cryptococcal antigen prevalence in HIV-infected Tanzanians: a cross-sectional study and evaluation of a point-of-care lateral flow assay. **Tropical medicine & international health: TM & IH**, v. 18, n. 9, p. 1075–1079, set. 2013.

SABIITI, W. et al. Efficient phagocytosis and laccase activity affect the outcome of HIV-associated cryptococcosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 5, p. 2000–2008, maio 2014.

SABIITI, W.; MAY, R. C. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Future Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1297–1313, nov. 2012.

SAHA, D. C. et al. Detection of *Cryptococcus* by conventional, serological and molecular methods. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. Pt 8, p. 1098–1105, ago. 2009.

SAMARASINGHE, H. et al. Fantastic yeasts and where to find them: The discovery of a predominantly clonal *Cryptococcus neoformans* population in Saudi Arabian soils. **FEMS Microbiology Ecology**, jul. 2019.

SANCHINI, A. et al. Molecular typing of clinical *Cryptococcus neoformans* isolates collected in Germany from 2004 to 2010. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 203, n. 5, p. 333–340, out. 2014.

SANFELICE, F. Contributo alla morfologia e biologia dei blastomiceti che si sviluppano nei succhi di alcuni frutti [Contribution on the morphology and biology of blastomyces that grows in certain fruit juice]. **Ann Igien**, v. 4, p. 463–495, 1894.

SATO, Y. et al. Rapid diagnosis of cryptococcal meningitis by microscopic examination of centrifuged cerebrospinal fluid sediment. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 164, n. 1, p. 72–75, 15 mar. 1999.

SEELIGER, H. P. Use of a urease test for the screening and identification of cryptococci. **Journal of Bacteriology**, v. 72, n. 2, p. 127–131, ago. 1956.

SEVERO, C. B. et al. Cryptococcosis in children. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 10, n. 4, p. 166–171, dez. 2009.

SHANKAR, S. K. et al. Pathobiology of fungal infections of the central nervous system with special reference to the Indian scenario. **Neurology India**, v. 55, n. 3, p. 198, 2007.

SHIBUYA, K. et al. Histopathology of cryptococcosis and other fungal infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **International journal of infectious diseases**, v. 5, n. 2, p. 78–85, 2001.

SIDDIQUI, A. A. et al. IFN-gamma at the site of infection determines rate of clearance of infection in cryptococcal meningitis. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 174, n. 3, p. 1746–1750, 1 fev. 2005.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. [s.l.] Guanabara Koogan, 2004.

SINGH ET AL. N.; FORREST, G.; THE AST INFECTIOUS DISEASES COMMUNITY OF PRACTICE. Cryptococcosis in Solid Organ Transplant Recipients. **American Journal of Transplantation**, v. 9, p. S192–S198, dez. 2009.

SIONOV, E. et al. Heteroresistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* is intrinsic and associated with virulence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 7, p. 2804–2815, jul. 2009.

SLOAN, D. J.; PARRIS, V. Cryptococcal meningitis: epidemiology and therapeutic options. **Clinical Epidemiology**, v. 6, p. 169–182, 2014.

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

SORRELL, T. C. et al. Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 5, p. 1253–1260, maio 1996.

SOUTO, A. C. P. et al. Population Genetic Analysis Reveals a High Genetic Diversity in the Brazilian *Cryptococcus gattii* VGII Population and Shifts the Global Origin from the Amazon Rainforest to the Semi-arid Desert in the Northeast of Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 8, p. e0004885, 2016.

SPITZER, E. D.; SPITZER, S. G. Use of a dispersed repetitive DNA element to distinguish clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 5, p. 1094–1097, maio 1992.

SPRINGER, D. J.; CHATURVEDI, V. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 14–20, jan. 2010.

STAIB, F. *Cryptococcus neoformans* und *Guizotia abyssinica* (syn. *G. oleifera* DC). **Medical Microbiology and Immunology**, v. 148, n. 5, p. 466–475, 1962.

STAMM, A. M.; POLT, S. S. False-negative cryptococcal antigen test. **JAMA**, v. 244, n. 12, p. 1359–1359, 1980.

STODDARD, J.; CUTLER, E. *Torula* infection in man. A group of cases, characterized by chronic lesions of the central nervous system, with clinical symptoms suggestive of cerebral tumor, produced by an organism belonging to the *Torula* group (*Torula histolytica* n. sp.). **Studies from the Rockefeller Institute for Medical Research**, v. 25, p. 1–98, 1916.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, dez. 2013.

TANNER, D. C. et al. Comparison of commercial kits for detection of cryptococcal antigen. **Journal of clinical microbiology**, v. 32, n. 7, p. 1680–1684, 1994.

TENFORDE, M. W. et al. Immune correlates of HIV-associated cryptococcal meningitis. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 3, p. e1006207, 2017.

THANH, L. T. et al. Multi-Locus Sequence Typing of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* from Laos in a regional and global context. **Medical Mycology**, 19 out. 2018.

THOMPSON, G. R. et al. Isavuconazole Treatment of Cryptococcosis and Dimorphic Mycoses. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 63, n. 3, p. 356–362, 1 ago. 2016.

TREVIJANO-CONTADOR, N. et al. Cryptococcus neoformans can form titan-like cells in vitro in response to multiple signals. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 5, p. e1007007, 2018.

TRILLES, L. et al. Regional pattern of the molecular types of Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii in Brazil. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 455–462, ago. 2008.

VANHOVE, M. et al. Genomic epidemiology of Cryptococcus yeasts identifies adaptation to environmental niches underpinning infection across an African HIV/aids cohort. **Molecular Ecology**, v. 26, n. 7, p. 1991–2005, abr. 2017.

VECCHIARELLI, A. et al. Downregulation by cryptococcal polysaccharide of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta secretion from human monocytes. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 8, p. 2919–2923, ago. 1995.

VELAMAKANNI, S. S. et al. Central nervous system cryptococcoma in a Ugandan patient with Human Immunodeficiency Virus. **Medical mycology case reports**, v. 6, p. 10–13, 2014.

VELEZ, N. et al. Genotypic Diversity Is Independent of Pathogenicity in Colombian Strains of Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii in Galleria mellonella. **Journal of Fungi (Basel, Switzerland)**, v. 4, n. 3, 5 jul. 2018.

VÉLEZ, N.; ESCANDÓN, P. Distribution and association between environmental and clinical isolates of Cryptococcus neoformans in Bogotá-Colombia, 2012-2015. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 10, p. 642–648, out. 2016.

VIBHAGOOL, A. et al. Discontinuation of secondary prophylaxis for cryptococcal meningitis in human immunodeficiency virus-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy: a prospective, multicenter, randomized study. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 36, n. 10, p. 1329–1331, 15 maio 2003.

VIVIANI, M. A. et al. Molecular analysis of 311 Cryptococcus neoformans isolates from a 30-month ECMM survey of cryptococcosis in Europe. **FEMS yeast research**, v. 6, n. 4, p. 614–619, 2006.

VUILLEMIN, J.-P. Les blastomycètes pathogènes [Pathogenic blastomycetes]. **Revue Générale des Sciences Pures et Appliquées**, v. 12, p. 732–751, 1901.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-dopa decreases its susceptibility to amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 11, p. 2648–2650, nov. 1994.

WIESNER, D. L. et al. Cryptococcal genotype influences immunologic response and human clinical outcome after meningitis. **mBio**, v. 3, n. 5, 2012.

WILLIAMS, D. A. et al. Evaluation of fingerstick cryptococcal antigen lateral flow assay in HIV-infected persons: a diagnostic accuracy study. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 61, n. 3, p. 464–467, 1 ago. 2015.

WILLIAMSON, P. R. et al. Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. **Nature Reviews Neurology**, v. 13, n. 1, p. 13, 2017.

WILSON, D. E.; BENNETT, J. E.; BAILEY, J. W. Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)**, v. 127, n. 3, p. 820–823, mar. 1968.

WU, S.-Y. et al. Molecular characterisation of clinical *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from Sichuan province, China. **Mycoses**, v. 58, n. 5, p. 280–287, maio 2015.

XU, J.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T. G. Multiple gene genealogies reveal recent dispersion and hybridization in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 10, p. 1471–1481, out. 2000.

YANG, C.-J. et al. Clinical and radiographic presentations of pulmonary cryptococcosis in immunocompetent patients. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 38, n. 9, p. 788–793, 2006.

YAO, Y. et al. Voriconazole: a novel treatment option for cryptococcal meningitis. **Infectious Diseases (London, England)**, v. 47, n. 10, p. 694–700, 2015.

ZHOU, Q. et al. Immunomodulation with CD40 stimulation and interleukin-2 protects mice from disseminated cryptococcosis. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 4, p. 2161–2168, abr. 2006.