



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

ERTÊNIA PAIVA OLIVEIRA

**CRIOCOCOSE: DETERMINAÇÃO DO PERFIL CLÍNICO-DEMOGRÁFICO DE
PACIENTES COM AIDS ATENDIDOS EM UNIDADES DE SAÚDE PÚBLICA DE
PERNAMBUCO**

RECIFE
2021

ERTÊNIA PAIVA OLIVEIRA

**CRÍPTOCOCOSE: DETERMINAÇÃO DO PERFIL CLÍNICO-DEMOGRÁFICO DE
PACIENTES COM AIDS ATENDIDOS EM UNIDADES DE SAÚDE PÚBLICA DE
PERNAMBUCO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos. Área de Concentração: Micologia Médica

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto

RECIFE

2021

Catálogo na Fonte:
Elaine C Barroso, CRB-4/1728

Oliveira, Ertênia Paiva

Criptococose: determinação do perfil clínico-demográfico de pacientes com AIDS atendidos em unidades de saúde pública de Pernambuco / Ertênia Paiva Oliveira – 2021.

119 f.: il., fig., tab.

Orientador: Reginaldo Gonçalves de Lima Neto

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, Recife, 2021.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Micoses 2. Epidemiologia 3. Genética I. Lima Neto, Reginaldo Gonçalves de (orient.) II. Título

579.5

CDD (22.ed)

UFPE/CB-2021-234

ERTÊNIA PAIVA OLIVEIRA

**CRIOCOCOSE: DETERMINAÇÃO DO PERFIL CLÍNICO-DEMOGRÁFICO DE
PACIENTES COM AIDS ATENDIDOS EM UNIDADES DE SAÚDE PÚBLICA DE
PERNAMBUCO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos. Área de Concentração: Micologia Médica

Recife, 30 de Abril de 2021

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto
Universidade Federal de Pernambuco
(ORIENTADOR)

Prof^a. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães
Universidade Federal de Pernambuco
(MEMBRO INTERNO)

Dra. Claudia Fernanda Lacerda Vidal
Hospital das Clínicas- UFPE
(MEMBRO EXTERNO)

Prof^a. Dra. Danielle Patrícia Cerqueira Macedo
Universidade Federal de Pernambuco
(MEMBRO EXTERNO)

Prof. Dr. Guilherme Maranhão Chaves
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
(MEMBRO EXTERNO)

Dedico este trabalho à **Deus** primeiramente, por sempre me dar forças e discernimento para continuar esta jornada, em seguida, aos meus amados pais **Francisco Leonardo de Oliveira** e **Maria Edicleide Paiva Pinto** que sempre demonstraram muito orgulho e me apoiarem em todos os momentos. Dedico também aos meus irmãos **Elton Telles Paiva Oliveira**, **Erta Maria Paiva Oliveira** e **Elvis Paiva de Oliveira** por todo apoio e confiança depositada, por último e não menos importante, a minha avó **Maria Francisca de Paiva Pinto**, por ter sido um SER de extrema importância na minha vida e educação, uma segunda MÃE.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, por ter me dado a dádiva de mais uma oportunidade e conquista, por sempre sentir sua presença no meu dia-a-dia. A ele, só GRATIDÃO.

A minha mãe, Maria Edicleide Paiva Pinto Oliveira, por sempre estar comigo nos momentos mais difíceis, acreditando no meu potencial mesmo quando eu duvidava, e também, por sempre se referir a mim com imensa satisfação e orgulho.

Ao meu pai, Francisco Leonardo de Oliveira, que mesmo em sua ausência me deu forças para buscar ser alguém melhor e conquistar meus objetivos.

Aos meus amados irmãos, Elton Paiva, Erta Maria, Elvis Paiva e Maria Vitória, por sempre manifestarem orgulho para comigo, apoiando-me em todos os momentos e decisões.

A minha avó, Maria Francisca de Paiva Pinto, por ter me criado, me apoiado, me dado muito amor e a todo momento expressando o quanto sente orgulho da minha trajetória.

Aos meus familiares: tias, tios, primos e primas, que acreditaram no meu mérito, sempre na torcida para que tudo tivesse êxito.

Aos meus amigos, Carlor Nobrega, Glauber, François, |Conceição e Sofia, por sempre estarem comigo, me apoiando, me dando um ombro amigo quando foi preciso, um conselho quando necessário, e muitas vezes uma luz quando eu não conseguia ver. GRATIDÃO a vocês.

Aos meus amiguinhos da micologia médica, Adryelle, Ana Emília, Bruna Sousa, Carlos Valeriano, Cícero Pinheiro, Daniela Buonafina, Franz, Jucieli Freitas, Melyna Chaves, Pamella Ximenes e Tatiana Oliveira, no entanto, tenho GRATIDÃO de forma especial a BRUNA e JUCIELI, por sempre me ajudarem e estarem constantemente presente em meus experimentos e momentos de desespero. Muito obrigada...Amo vocês!!!!

Aos professores da micologia médica e agregados, Prof. Armando, Prof^a. Oliane Magalhães, Prof^a. Rejane Neves e Prof^a. Danielle Macedo, minha imensa gratidão por todos os ensinamentos.

A banca examinadora e suplentes por aceitarem participar desta etapa tão valorosa para meu crescimento profissional e de vida.

Ao meu orientador, professor Reginaldo Gonçalves de Lima Neto, pela contribuição para mais um ciclo e mais um degrau alcançado sob sua orientação, agradeço também pela paciência, persistência e tempo depositado nesse propósito.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), ao Hospital das Clínicas (HC), ao Hospital Correia Picanço (HCP), em especial ao Biomédico Dr. Paulo Veigas, todos foram de extrema importância para o desenvolvimento e execução da minha tese.

Ao CNPq, pelo financiamento da minha bolsa de doutorado, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos (PPGBF), ao Departamento de Micologia Médica e, em especial ao laboratório Silvio Campos e a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Gratidão pelo espaço e estrutura para que minha pesquisa fosse realizada.

Quero aproveitar o momento e, também deixar a minha HOMENAGEM as inúmeras vítimas do COVID-19, exprimindo minhas condolências a todas as famílias que perderam algum ente querido. *“Muitas vezes é difícil encontrar as palavras certas em um momento como este, jamais inimaginável e tão comovente, no entanto, desejo que todas estas famílias encontrem PAZ, CONFORTO, RESPEITO, SABEDORIA e, que tenham FÉ, para superarem este momento tão difícil. Desejo-lhes também ESPERANÇA de dias melhores”.*

RESUMO

A Criptococose é uma micose causada por *Cryptococcus*. No Brasil essa infecção não é notificação obrigatória, e as autoridades de saúde pública não podem determinar a morbimortalidade. O objetivo deste trabalho foi diagnosticar e caracterizar o perfil clínico-epidemiológico e demográfico da criptococose em pacientes internados em dois hospitais públicos terciários em Nordeste do Brasil. O estudo foi dividido em três momentos: 1) Isolamento do fungo e diagnóstico de amostras biológicas coletadas entre 2017 e 2019, 2) Descrição das características epidemiológicas e sociodemográficas dos prontuários e 3) Testes experimentais: perfil de suscetibilidade *in vitro*, identificação pelo MALDI-TOF MS, e recombinação genética através do PCR ERIC. Dos 100 pacientes avaliados, 24 (24,5%) foram diagnosticados com criptococose baseado na cultura positiva. A análise clínico-epidemiológica mostrou a maior prevalência em homens entre 30 e 39 anos. A neurocriptococose foi a forma clínica mais prevalente, a febre foi o sinal clínico mais relatado. O líquido cefalorraquidiano mostrou positividade em 100% das amostras. A taxa de mortalidade neste estudo foi menor em relação as outras literaturas. O antifungograma apresentou 20 (83,33%) isolados suscetíveis à anfotericina B, 15 (62,5%) para o fluconazol, e 17 (71%) para nitrothiophene-tiossemicarbazone. A espectrometria de massa identificou 100% dos isolados. A técnica ERIC-PCR foi 100% eficaz nas análises. Os dados obtidos nesta pesquisa poderão contribuir para o conhecimento dessa micose no Brasil, além de servir de base para futuros estudos epidemiológicos globais.

Palavras-chave: *Cryptococcus* sp.; Epidemiologia; Sensibilidade antifúngica; Relações genéticas.

ABSTRACT

Cryptococcosis is a mycosis caused by *Cryptococcus*. In Brazil this infection is not mandatory notification, and public health authorities cannot determine morbidity. The objective of this work was to diagnose and characterize the clinical-epidemiological and demographic profile of cryptococcosis in patients admitted to two tertiary public hospitals in Northeastern Brazil. The study was divided into three moments: 1) Isolation of the fungus and diagnosis of biological samples collected between 2017 and 2019, 2) Description of the epidemiological and sociodemographic characteristics of the medical records and 3) Experimental tests: profile of susceptibility *in vitro*, identification by MALDI-TOF MS, and genetic recombination through ERIC PCR. Of the 100 patients evaluated, 24 (24.5%) were diagnosed with positive culture-based cryptococcosis. Clinical and epidemiological analysis showed the highest prevalence in men between 30 and 39 years of age. Neurocryptococcosis was the most prevalent clinical form, fever was the most reported clinical sign. Cerebrospinal fluid showed positivity in 100% of the samples. The mortality rate in this study was lower than the other literature. The antifungogram presented 20 (83.33%) isolates susceptible to amphotericin B, 15 (62.5%) fluconazole, and 17 (71%) for nitroimidazole-triazole. Mass spectrometry identified 100% of the isolates. The ERIC-PCR technique was 100% effective in the analyses. The data obtained in this research may contribute to the knowledge of this mycosis in Brazil, besides serving as a basis for future global epidemiological studies.

Keywords: *Cryptococcus* sp.; Epidemiology; Antifungal sensitivity; Genetic relationships.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo de infecção do gênero <i>Cryptococcus</i> sp.....	28
Figura 2 - Número de internações por micoses sistêmicas no Brasil (2000-2007).....	30
Figura 3 - Número de internações por criptococose (2000-2007), por regiões do Brasil.....	31
Figura 4 - Estrutura química da anfotericina B.....	39
Figura 5 - Estrutura química da (a) citosina; (b) flucitosina (c) 5-fluorouracil.....	41
Figura 6 - Estrutura química do fluconazol.....	42
Figura 7 - Estrutura química do itraconazol.....	43
Figura 8 - Estrutura química do voriconazol.....	43
Figura 9 - Estrutura química do posaconazol.....	44
Figura 10 - Diagrama de fluxo de etapas no diagnóstico e registro médico no HC e HCP.....	54
Figura 11 - Distribuição do número de casos de criptococose no estado do Pernambuco.....	60
Figura 12 - Taxa de detecção de aids de acordo com as regiões, por ano no Brasil....	62
Figura13 - Frequência de demais infecções em pacientes coinfectados com HIV e Criptococose.....	63
Figura 14 - Comparativo entre o diagnóstico do HIV e o tempo de desenvolvimento da criptococose.....	64
Figura 15 - Tempo entre os sintomas e internação hospitalar por criptococose.....	65
Figura 16 - Esquema terapêutico utilizada nos casos de criptococose.....	68
Figura 17 - Dendograma de oito isolados de <i>Cryptococcus</i> sp. gerados a partir de bases genéticas através de fragmentos amplificados pelo ERIC-PCR.....	75
Figura 18 - Relação genética das espécies de acordo as regiões de moradia dos pacientes.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i> : tipos moleculares (TM), distribuição geográfica e clínica.....	24
Tabela 2 - Nova proposta para as espécies do Complexo <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> ..	26
Tabela 3 - Sinais e sintomas clínicos observados na infecção por <i>Cryptococcus</i> sp..	32
Tabela 4 - Diagnóstico laboratorial para criptococose.....	55
Tabela 5 - Distribuição dos casos de criptococose de acordo com faixa etária e sexo dos pacientes atendidos em duas unidades de saúde do Pernambuco.....	57
Tabela 6 - Número de casos em meses e ano de internação por neurocriptococose.	61
Tabela 7 - Frequência dos sinais e sintomas clínicos apresentados pelos pacientes com criptococose.....	66
Tabela 8 - Sensibilidade antifúngica contra isolados clínicos de <i>Cryptococcus</i>	70
Tabela 9 - Eficácia dos antifúngicos e molécula de tiofeno testada <i>in vitro</i>	72
Tabela 10 - Identificação do Complexo <i>Cryptococcus</i> utilizando o MALDI-TOF/MS...	73

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FC	5Flucitosina
ABCD	Anfotericina B em Dispersão Coloidal
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
ABLC	Complexo Lipídico de Anfotericina B
ANF B	Anfotericina B
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	<i>Adenosine TriPhosphate</i>
CCP	Criptococose Cutânea Primária
CCS	Criptococose Cutânea Secundária
CETENE	Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CID	Classificação Estatística Internacional de Doenças
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CNS	Conselho Nacional de Saúde
D-AMB	Anforeticina B Desoxicolato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EBSERH	Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares
ED	Exame Direto
ERG	Ergosterol
ERIC	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus elements</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FLC	Fluconazol
GAL	Gerenciador de Ambiente Laboratorial
GMS	Metenamina de Prata de Grocott-Gomori
HC	Hospital das Clínicas
HCP	Hospital Correia Picanço
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HE	Hematoxilina Eosina

HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
ICCC-	Conferência Internacional de Criptococose
KOH	Hidróxido de Potássio
L-AMB	Anfotericina B Lipossomal
LBA	Lavado Broncoalveolar
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
MS	Ministério da Saúde
NTT	Nitrotiofeno-tiosemicarbazônicos
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
PMC	Paracoccidiodomicose
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição
SAME	Serviço de Arquivamento Médico e Estatístico
SDIA	Sociedade de Doenças Infeciosas da América
SES	Secretaria Estadual de Saúde
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SIH	Sistema de Informações Hospitalares
SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde
TARV	Tratamento Antirretroviral
TM	Tipo Molecular
TVP	Trombose Venosa Profunda
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
URM	<i>University Recife Mycologia</i>
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
3.1	HISTÓRICO.....	19
3.2	POSIÇÃO TAXONÔMICA.....	22
3.3	O COMPLEXO <i>Cryptococcus neoformans</i>	23
3.3.1	Nova proposta taxonômica: Complexo <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>.	25
3.4	A CRIPTOTOCOSE.....	27
3.4.1	Epidemiologia	28
3.4.2	Patogenia	31
3.4.3	Diagnóstico	33
3.4.4	Identificação	35
3.4.4.1	Identificação Clássica.....	35
3.4.4.2	Identificação proteômica: MALDI-TOF MS.....	36
3.4.4.3	Caracterização molecular.....	36
3.4.4.3.1	<i>Caracterização molecular: PCR baseado em elementos repetitivos (Rep-PCR)</i>	37
3.4.5	Tratamento	38
3.4.5.1	Anfotericina B.....	38
3.4.5.2	5-Flucitosina.....	41
3.4.5.3	Azólicos.....	42
3.4.4.4	Resistência antifúngica.....	44
3.4.5.5	Novas alternativas terapêuticas.....	46
4	MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1	APECTOS ÉTICOS.....	48
4.2	TIPO E LOCAL DE ESTUDO.....	48
4.3	OBTENÇÃO DOS ISOLADOS.....	48
4.4	TESTE DE AGLUTINAÇÃO EM LATEX.....	49
4.5	CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL CLÍNICO-DEMOGRÁFICO.....	49
4.6	SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA <i>in vitro</i>	50

4.7	IDENTIFICAÇÃO PROTEÔMICA POR MALDI-TOF/MS.....	51
4.8	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR ATRAVÉS do ERIC-PCR.....	52
4.9	ANÁLISES DE DADOS.....	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	54
5.1	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	54
5.2	PERFIL CLÍNICO-DEMOGRÁFICO.....	56
5.3	SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA <i>in vitro</i>	69
5.4	IDENTIFICAÇÃO PROTEOMICA PELO MALDI-TOF/MS.....	72
5.5	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR ATRAVÉS DO ERICK-PCR.....	74
6	CONCLUSÃO.....	78
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
	APÊNDICE A: artigo 1 - Tuberculo and neurocriptococosis by <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> in a patient: a comorbidities case report.....	93
	APÊNDICE B: artigo 2 - Cryptococcosis: clinical-epidemiological and demographic features and genetic relationship among clinical yeasts.....	94
	APÊNDICE C: Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (12 A 18 anos).....	95
	APÊNDICE D: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Maiores de 18 ou emancipados).....	98
	APÊNDICE E: Termo de Consentimento Livre Esclarecido (para adultos impossibilitados de assinar o TCLE).....	101
	APÊNDICE F: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (para responsável legal pelo menor de 18 anos)	104
	APÊNDICA G: Termo de Compromisso e Confidencialidade.....	107
	APÊNDICE H: Intrumento para Coleta de Dados.....	108
	ANEXO A: Termo de Aprovação do Comitê de Ética.....	110
	ANEXO B: Cartas de Anuências do Hospital das Clínicas.....	115
	ANEXO C: Carta de Anuência do Cetene.....	118
	ANEXO D: Carta de Anuência do Hospital Correia Picanço.....	119

1 INTRODUÇÃO

A criptococose é uma micose de natureza sistêmica, causada por um complexo de fungos patogênicos incluídos no gênero *Cryptococcus*, cuja porta de entrada principal é a via inalatória. Dentre as micoses sistêmicas, a criptococose ganhou relevância por se tratar de uma infecção oportunista, acometendo indivíduos que convivem ou não com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (FILIÚ et al., 2002; SILVA et al., 2008; BRASIL, 2012). As leveduras do gênero *Cryptococcus* apresentam distribuição mundial, tendo como substratos, ar, solo, água, excretas de aves (especialmente pombos), superfície e mucosa de animais, folhas, flores e madeira em decomposição. Nas excretas de pombos, os propágulos fúngicos podem permanecer viáveis para contágio por um período de até dois anos (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992; KURTZMAN e FELL, 1998; REOLON, et al., 2004).

Taxonomicamente classificado como pertencente ao filo Basidiomycota (ZHAO et al., 2019), o gênero *Cryptococcus* é composto atualmente por mais de 70 espécies, das quais duas, *C. neoformans* e *C. gattii* são consideradas patogênicas, formando o complexo *Cryptococcus neoformans*. O Complexo engloba cinco sorotipos: A, B, C, D e AD, estes, se diferem nos aspectos bioquímicos, ecológicos, antigênicos e genéticos (REOLON et al., 2004; RIBAS et al., 2011; ARAÚJO-JÚNIOR et al., 2015).

As leveduras do complexo *C. neoformans* possuem alguns fatores de virulência, no entanto, três são classificadas como fatores primários: a cápsula polissacarídica, a melanina, e a adaptação à temperatura corpórea. A cápsula impede a fagocitose e sua destruição mediada por macrófagos, neutrófilos e monócitos, bloqueando a ação do sistema imune (GRECHIE et al., 2011). A melanina protege a célula dos estresses ambientais. A temperatura possibilita a propagação e desenvolvimento fúngico no corpo humano, favorecendo a infecção (DESJARDINS et al., 2019).

Para o diagnóstico da criptococose, o método mais utilizado é a visualização de leveduras encapsuladas no líquido cefalorraquidiano (LCR) por meio da pesquisa microscópica direta, utilizando a tinta nanquim (tinta da china) como contrastante com a obtenção de cerca de 95% de sensibilidade. Concomitantemente, realiza-se a cultura para o isolamento do fungo à temperatura que varia de 25 a 37 °C, sendo considerada o “padrão ouro” no diagnóstico da criptococose (Kon et al., 2008). Quando a cultura apresenta-se positiva, em 48h de incubação é possível visualizar o crescimento de uma colônia de aspecto mucóide e de coloração creme. Pode-se utilizar também outros exames com o objetivo de auxiliar e complementar o diagnóstico em casos mais

complexos, tais como, testes sorológicos, em especial o de aglutinação em látex (sensibilidade > 90%), de imagens, além de métodos moleculares que vêm sendo cada vez mais utilizados para a detecção de *Cryptococcus* spp. tanto em líquido como em outros materiais biológicos tais como, sangue, urina, secreção, material obtido por biopsia e lavado broncoalveolar (BACKES et al., 2016).

Tecnologias baseadas em ferramentas moleculares são métodos eficazes na caracterização, gerenciamento de recursos genéticos, programa de melhoramento genético e na avaliação de diversidade genética entre espécies. Atualmente, existem uma grande variedade de métodos a partir da amplificação de DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) por meio da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) objetivando a determinação de genótipos em isolados de forma individual, tais como: reação e cadeia polimerase-técnica de polimorfismo de comprimento de fragmento (PCR-RFLP), eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), e a amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD). Entretanto, essas técnicas revelam grande homogeneidade genética das espécies, refletindo algumas limitações nas identificações das cepas (DORNELES et al., 2014). Sendo assim, existem duas técnicas de PCR baseadas em elementos repetitivos (Rep-PCR) tais como: BOX e ERIC que, atualmente tem sido muito utilizada para estudar padrões de elementos de DNA repetitivos presentes em genomas bacterianos (STATE et al., 2008; SAVARI et al., 2016).

A terapêutica padrão empregada no tratamento desta micose sistêmica implica na administração intravenosa de anfotericina B ou seus derivados lipídicos, e do uso de 5-flucitosina e alguns azólicos, principalmente o fluconazol em combinação ou não com a anfotericina B. No entanto, esta combinação vem gerando resistências e recidivas, mesmo que ainda de forma esporádicas ou mesmo raras, o que tem estimulado a realização de testes de susceptibilidade *in vitro* com o propósito de prever o sucesso da terapia antifúngica, bem como buscar outras alternativas de escolha como estratégia de controle e erradicação destes agentes infecciosos, visto que, as opções terapêuticas existentes no mercado provocam diversas reações e efeitos colaterais aos pacientes em tratamento (ALMEIDA e MACHADO, 2014).

Embora existam pesquisas sobre a criptococose, estudiosos acreditam que ainda há muito a ser desvendado em relação ao “complexo *Cryptococcus neoformans*”, motivos estes, que vêm gerando vários debates e discussões em eventos científicos nacionais e internacionais sobre questionamentos taxonômicos. Adicionalmente, necessita-se de mais pesquisas e produção de conhecimentos a respeito da doença e principalmente acerca do perfil epidemiológico no Brasil, em especial no estado de Pernambuco. Sendo assim,

deve-se ressaltar a importância deste estudo, pois é necessário a compreensão do perfil clínico-demográfico dos pacientes acometidos, assim como o perfil epidemiológico da doença, uma vez que a criptococose, segundo o Departamento de Vigilância Epidemiológica do Brasil, é relatada como a micose mais prevalente em termos de internações hospitalares entre os anos de 2000 a 2007, além de gerar a cada ano milhares de óbitos evitáveis caso fosse aplicado um diagnóstico mais rápido e um tratamento mais eficaz, e sem muitos efeitos colaterais. Vale também ressaltar, que não há atualizações de dados após este período.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Diagnosticar e caracterizar o perfil clínico-demográfico dos casos de criptococose em pacientes internados em duas Unidades de Saúde Pública Terciária no estado do Pernambuco, identificar a diversidade microevolutiva por meio do ERIC-PCR e propor uma nova alternativa terapêutica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter as amostras biológicas em duas Unidades de Saúde Pública no estado do Pernambuco;
- Realizar o diagnóstico e a identificação dos isolados clínicos ao taxón das espécies;
- Caracterizar o perfil sócio-demográfico e clínico-epidemiológico da criptococose em pacientes atendidos em dois Serviços de Referência de Pernambuco;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) da anfotericina B, fluconazol e testar a atividade microbiológica da molécula de derivado do anel aromático de tiofenos, além de comparar sua eficácia para os isolados do complexo *Cryptococcus neoformans* através do teste de sensibilidade antifúngica;
- Determinar a dinâmica populacional através do ERIC-PCR dos isolados fúministeriongico obtidos.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 HISTÓRICO

A criptococose, também conhecida como: tolurose, blastomicose europeia, doença de Busse-Bruschke, foi descrita pela primeira vez por Zenker em 1861, contudo, teve sua descrição questionável por não conseguir isolar o microrganismo (HEITMAN et al., 2011; BRASIL, 2012). Em 1894 na Itália, Francesco Sanfelice pela primeira vez descreveu leveduras encapsuladas e isoladas de suco de pêssigo. Em 1895 essas leveduras foram identificadas como patogênicas para um modelo experimental e denominada como *Saccharomyces neoformans* (SANFELICE, 1894; BARNETT, 2010; BRASIL, 2012). Ainda em 1894, Otto Busse e Abraham Bruschke, ganharam os créditos da primeira descrição, do futuro agente que seria denominado de *Cryptococcus*. Busse, um patologista do *Institute of Pathology at Greifswald University*, na Alemanha, presenciou corpúsculos ovais obtidos de uma lesão de sarcoma da tíbia em uma mulher com 31 anos e isolou o agente do tecido ósseo, denominando-o *Saccharomyces hominis* (BUSSE, 1894; LACAZ et al., 2002; BARNETT, 2010; HEITMAN et al., 2011).

Sanfelice, em 1895, reconheceu a relação genética entre seu isolado (*S. neoformans*) com o fungo isolado (*S. hominis*) de Busse e Bruschke (BRASIL, 2012). Curtis em 1986, isolou um fungo semelhante a uma levedura, oriundo de um material do quadril de um paciente. No entanto, observou algumas características distintas em relação as culturas isoladas por Busse e Sanfelice, e a descreveu como *Sachromyces Subcutaneos tumefaciens*, este mesmo isolado mais tarde, foi denominado como o primeiro registro clínico de *C. gattii* (CURTIS, 1986; KWON-CHUNG et al., 2014).

No início de 1900 apareceram inúmeros relatos da manifestação dessa levedura, principalmente no cérebro, pulmão e pele de humanos e animais, sendo reconhecido que, este agente patogênico estaria relacionado a infecção do Sistema Nervoso Central (SNC), onde a ausência de uma terapia eficaz cooperava para um prognóstico desfavorável (CASADEVALL e PERFECT, 1998; BRASIL, 2012).

Em 1901, Viulleman revisou os fungos isolados por Busse e Sanfelice e os transferiu para o gênero *Cryptococcus* (*C. hominis* e *C. neoformans*), respectivamente. Esta renomeação foi estabelecida pela inabilidade destas leveduras em fermentar açúcares e não formar ascósporos, características marcantes e básicas do gênero *Saccharomyces* (BARNETT, 2010; BRASIL, 2012; SHIKANTRA et al., 2014).

Em 1902, Frothingham confirmou a patogenicidade da levedura mediante uma lesão pulmonar em um cavalo, ocorrido em Massachusetts, sendo que o fungo isolado da lesão apresentava similaridade o isolado por Busse e Buschke, ficando comprovado que se tratava de um fungo patogênico para humanos como também para animais (HEITMAN et al., 2011). Três anos depois, em 1905, Van Hansemann relatou pela primeira vez a visualização do fungo na meninge humana, e descreveu a doença como tuberculose com leveduras em cistos gelatinosos (KWON-CHUNG e BENNET, 1992).

Em 1914, Versé relatou e diagnosticou uma meningite por *Cryptococcus* em uma paciente do sexo feminino. Dois anos mais tarde, Stoddard e Cutler relataram mais dois casos de meningite, no entanto, eles nomearam o fungo de *Torula histolytica* (HEITMAN et al., 2011; VERSÉ, 1914).

Benham em 1935, conduziu um estudo com dezenas de leveduras, sendo que 22 cepas eram patogênicas e as demais não patogênicas, todas isoladas de humanos, inclusive os isolados de Busse. Todos os isolados passaram por análises morfológicas, patogênica e sorológicas e, portanto, concluiu-se que todos os isolados analisados eram, certamente, uma espécie, *C. hominis*, e esta compreendia duas variedades. Então foi possível notar a diversidade e heterogeneidade que este agente manifesta, levando assim a sucessivas revisões taxonômicas (BENHAM, 1935; BRASIL, 2012).

Evans em 1949, identificou os sorotipos A, B e C baseando-se em diferentes reatividades capsulares frente a soros hiperimunes. O sorotipo D, foi descrito posteriormente, em 1968 por Wilson e colaboradores (EVANS, 1950; WILSON et al., 1968; KHOW-CHUNG et al., 2014). Em 1950, Benham sugeriu que o nome *tolurosi* e *tolura meningite* fosse renomeado para *criptococose*, e que o nome *Cryptococcus neoformans* fosse mantido, sendo esta terminologia rapidamente absorvida na literatura médica e micológica (BENHAM, 1950; HEITMAN et al., 2011). Emmons em 1951, isolou pela primeira vez *C. neoformans* a partir de substratos ambientais coletados na Virgínia, tais como, solos contaminados com excretas de aves, em especial de pombos, predizendo que esta infecção é adquirida a partir de ambientes contaminados (EMMONS, 1951; KHOW-CHUNG et al., 2014). Posteriormente, em 1962, Staib fez uma importante contribuição, onde relatou que *C. neoformans* quando cultivado em meio contendo sementes de *Guizotia abyssinica*, conhecido como semente de níger, apresentava coloração marrom (STAIB, 1962; KWON-CHUNG e BENNET, 1992).

Em 1970, Gattii e Eeckels descreveram um caso de meningite em um menino de 7 anos, do centro da África, com o isolado obtido através do líquido. Ainda em 1970, Vanbreuseghem e Takashio mencionaram que o isolado “*in vivo*”, produzia células

alongadas (semelhante a um grão de arroz), e na cultura apresentava leveduras capsuladas de formas arredondadas (forma usual) característico de *C. neoformans*, sendo assim, o isolado que apresentou células alongadas foi então descrito como uma nova variedade e foi apresentado como *C. neoformans* var. *gattii*, e posteriormente identificado como sorotipo B (GATTII e ECKELS, 1970; VANBREUSEGHEM e TAKASHIO, 1970; HEITMAN et al., 2011; BRASIL, 2012).

Apesar do *C. neoformans* ter sido isolado pela primeira vez em 1951, seu ciclo completo só pode ser descrito em 1975, quando Kwon-Chung observou que o *C. neoformans* apresentava dois tipos sexuais, denominado α e *a*, e que por meio de cruzamento entre cepas compatíveis foi obtido o estado teleomorfo da levedura, descrita como *Filobasidiella* (KWON-CHUNG, 1975; BARNETT, 2010).

Kwon-Chung e Bennett (1978), informaram que o *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii* se diferiam notavelmente, morfológicamente, bioquimicamente e sorologicamente, e que o isolado da criança de 7 anos era idêntico a um isolado teleomórfico *Filobasidiella bacillispora*. Foi então verificado que o *C. neoformans* var. *gattii* era sinônimo de *C. bacillusporus*. O *C. bacillusporus* foi renomeado como *C. gattii*, em 2002, pois o termo “*gattii*” era mais usual mundialmente que o termo “*bacillusporus*”.

A partir de 1980, surgiu a “era da AIDS”-*Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS; em inglês), traduzida como Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA; em português), onde foi constatado um marco da infecção da criptococose em todo o mundo, o que provocou interesse e notória expansão de pesquisa sobre esta micose (PIZANI; SANTOS, 2017).

Entre o final da década de 80 e início da de 90, a aplicação de métodos moleculares foram iniciados, esta nova ferramenta permitia a identificação, clonagem e caracterização de vários genes, dentre elas: a produção da melanina, da cápsula, genes relacionados a virulência, além dos genes ribossomais (MOORE e EDMAN, 1993; CHANG e KWON-CHUNG, 1994; WILLIAMSON, 1994).

Na Alemanha em 1990, foi descrito o primeiro isolamento de *C. neoformans* var. *gattii* (*C. gattii*, nomenclatura atual) (ELLIS e PFFEIFER, 1990a). Logo depois, sucessivos trabalhos realizados no Brasil, revelaram que ambas as variedades (*C. gattii* e *C. neoformans*), estão correlacionados a habitats naturais representados por madeira em decomposição em árvores tropicais, seja em ambientes urbanos, rurais ou silvestres (BRASIL, 2012).

Os aspectos epidemiológicos desta micose já se apresentavam de formas peculiares, tais como: ocorrência mundial, casos associados a linfomas e a tumores, a

uso de corticoides, pacientes diabéticos e usuários de drogas imunossupressoras, tendo como principal agente na maioria dos casos o *C. neoformans* var. *neoformans*, em especial do sorotipo A, sendo facilmente isolado de ambiente relacionado a habitat de aves. A criptococose também ocorria em áreas tropicais e subtropicais em indivíduos aparentemente saudáveis, ou seja, sem imunodepressão aparente, apresentando-se como micose primária causada por *C. neoformans* var. *gattii*, especialmente do sorotipo B, este, nunca tinha sido isolado do ambiente e, portanto, tinha seu habitat desconhecido (BRASIL, 2012).

Os aspectos taxonômicos e genéticos do gênero *Cryptococcus* estão sob análises até os dias atuais, com o intuito de que, nos anos subsequentes, seja possível uma visão e delimitação mais clara em relação à posição taxonômica deste grupo de fungos (BRASIL, 2012).

3.2 POSIÇÃO TAXONÔMICA

De acordo com Kurtzman e colaboradores (2011) e Hagen e colaboradores (2017), as espécies do complexo *Cryptococcus* (*C. neoformans* e *C. gattii*) no estado perfeito ou teleomórfico, são classificadas taxonomicamente como:

Reino: Fungi;

Filo: Basidiomycota

Classe: Tremellomycetes

Ordem: Tremellales

Família: Tremellaceae

Gênero: *Filobasidiella*

Espécies: *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans* (sorotipos A e D)

Filobasidiella neoformans var. *bacillispora* (sorotipo B e C)

E no estado imperfeito ou anamórfico, como:

Reino: Fungi;

Filo: Basidiomycota

Classe: Tremellomycetes

Ordem: Tremellales

Família: Tremellaceae

Gênero: *Cryptococcus*

Espécies: *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (sorotipos A e D)

Cryptococcus neoformans var. *gattii* (sorotipo B e C)

3.3 O COMPLEXO *Cryptococcus neoformans*

O gênero *Cryptococcus* é caracterizado por leveduras que se apresentam esféricas, globosas e/ou ovaladas com ou sem brotamentos, medindo 2,5-10µm de diâmetro, e ao apresentar sua típica cápsula mucopolissacarídica, pode chegar a 30 µm de diâmetro, estas estão dispersas no meio ambiente e, abarca mais de 70 espécies, destas, algumas patogênicas e causadoras da criptococose, tais como: *C. neoformans* e *C. gattii*, que afeta humanos e animais. Inicialmente estes agentes etiológicos foram considerados como uma só espécie, sendo posteriormente distinguidas por suas diferenças antigênicas, bioquímicas, ecológicas e genéticas, e passaram a ser classificadas em cinco sorotipos capsulares e oito genótipos moleculares. O *C. neoformans* possui (sorotipos A, D e AD), com suas variantes: *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A), *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D), *C. neoformans* entre var. *neoformans* e *C. gattii* (sorotipo AD) e o *C. gattii* (sorotipos B e C). A classificação dos sorotipos foram então, estabelecidas pelas diferenças das estruturas capsulares e do DNA (KWON-CHUNG et al, 2014; ARAÚJO-JÚNIOR et al., 2015; BOWEN et al., 2017; KWON-CHUNG et al, 2017).

O *C. neoformans* é um agente cosmopolita, isolado de excretas de aves (fonte nutritiva), em especial de pombos (*Columbia livia*), além de solo e árvores. É a espécie mais isolada nos casos de criptococose em humanos (geralmente imunocomprometidos) e animais, tendo suas variedades (A, D e AD), possuem a capacidade de colonizar a mucosa do papo de pombos sem causar doença, portando-se como agente endossapróbico natural de aves. Este grupo de fungos compreendem os principais tipos moleculares: VNI, VNII (VNB), VNIII e VNIV. Em contrapartida, o *C. gattii* é comumente isolado de árvores (*Eucalyptus camaldulensis*), espécies nativas e exóticas de regiões tropicais e subtropicais e está relacionado a infecções principalmente em hospedeiros imunocompetentes, ainda que, alguns estudos sugerem que os acometidos por esta espécie apresentam alguma deficiência imune não detectadas nos exames de rotina que os predispõe a meningoencefalite pelo *C. gattii* (ARAÚJO-JÚNIOR et al., 2015; FELIX-GONÇALVES et al., 2018). As infecções pelo *C. gattii*, ocorrem principalmente nas regiões amazônicas e em regiões do semi-árido do Nordeste brasileiro. Este grupo de fungos apresentam os principais tipos moleculares: VGI, VGII, VGIII e VGIV, sendo o VGI e VGIII relatado como os principais tipos moleculares em infecções de criptococose de humanos e animais até 1999 na América do Norte, enquanto que o tipo VGII foi citado como a causa do maior surto já visto, afetando centenas de pessoas e animais saudáveis

na Colúmbia Britânica, Canadá, um surto que posteriormente se alastrou para região Noroeste dos Estados Unidos (SOUTO et al., 2016).

Os oito tipos moleculares da classificação de *C. neoformans* e *C. gattii*, como mostra a **Tabela 1**, foram descobertos através de técnicas de PCR *fringerprinting* e Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado (AFLP) (MEYER et al., 2003).

Adicionalmente, Litvintseva e colaboradores (2006), sugeriram a classificação de um novo tipo molecular: VNB (sorotipo A haplóide), encontrado somente em isolados de Botswana, na África.

Tabela 1. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*: tipos moleculares (TM), distribuição geográfica e clínica.

Espécies/ híbrido	Sorotipos	TM	AFLP	Distribuição geográfica	Clínica
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	A	VNI	AFLP1	Global	Imunocomprometidos : HIV, e casos de imunocompetentes na China e Coréia.
	A	VNII	AFLP1A/ 1B	Austrália	Imunocomprometidos , e raros em imunocompetentes.
	A	VNB	AFLP1B	Bostawana, África	Imunocomprometidos , e raros em imunocompetentes.
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> - <i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	AD ^{II}	VNIII	AFLP3	Europa e América do Sul	Imunocomprometidos , e raros em imunocompetentes.
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	D	VNIV	AFLP2	Europa, América do Sul	Imunocomprometidos : HIV, e raros em imunocompetentes.
<i>C. gattii</i>	B	VGI	AFLP4	Global e sul da Califórnia	Imunocomprometidos , e raros em imunocompetentes.
	B e C	VGII	AFLP6	Califórnia e América do Norte e Sul	Imunocompetentes.
	C	VGIII	AFLP5	Global Observado com mais frequência no Sul da Califórnia,	Casos esporádicos, sendo mais comum em portadores de HIV.

			México e América Central e do Sul	
B e C	VGIV	AFLP7	África, Índia e América do Sul	Raro, sendo mais comum em portadores de HIV.

^π Sorotipo híbrido; TM= tipos moleculares; AFLP= Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado. A tabela foi construída e adaptada de acordo com os dados de Meyer et al., 2003; Espinel-Ingroff et al., 2012; Springer et al., 2014.

3.3.1 Nova proposta taxonômica: Complexo *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*

Após muitos debates e pouco mais de 15 anos de estudos através de técnicas moleculares genotípicas e fenotípicas, em 2015 foi sugerido uma nova revisão taxonômica para o gênero *Cryptococcus*. Recentemente, através do MLST (*Multilocus Sequence Typing*) uma técnica atualmente muito utilizada, foi proposto o reconhecimento de sete novas espécies para o gênero *Cryptococcus*. As duas variedades do *C. neoformans* foram elevadas a nível de espécie e o mesmo estabelecido para cinco genótipos dentro do *C. gattii*, uma vez que a variedade e diversidade das espécies estão genotipicamente mal representada dentro do complexo. E ainda foi proposto que o *C. gattii* e o *C. neoformans* sejam estabelecidos como complexo independentes, pois acredita-se que estas espécies sejam fenotipicamente crípticas, porém, são espécies que ainda estão em evolução. No entanto, esta proposta ainda é prematura e vem sendo muito criticada, sendo necessário que se haja um consenso dentro da comunidade científica, a fim de evitar conflitos. Em 2017, em Foz do Iguaçu foi realizada a 10ª Conferência Internacional sobre *Cryptococcus* e Criptococose (ICCC10), neste encontro o assunto sobre a revisão taxonômica foi mais uma vez discutido, e fornecidos indícios de que há pelo menos sete novas espécies. (HAGEN et al, 2017; KWON-CHUNG et al., 2017).

A Sociedade Internacional de Micologia Humana e Animal (ISHAM) por meio da realização de um trabalho de genotipagem do *C. neoformans* e *C. gattii* recomendou para a técnica MLST o uso de sete loci: CP59, GPD1, IGS1, LAC1, PBL, SOD1 e URA5. A nova proposta por meio do MLST identificou as sete espécies separadas, e exclui a espécie híbrida (*C. neoformans* var. *grubii* - *C. neoformans* var. *neoformans*). O complexo *C. neoformans* seria representado por duas espécies: *C. neoformans* (sorotipo A: VNI/AFPL1; VNII/AFPL 1A-1B; VNB/VNB), anteriormente *C. neoformans* var. *grubii*. O *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D: VNIV/AFLP2), ficaria representado por *C.*

deneoformans. O sorotipo AD/híbrido (*C. neoformans* var. *grubii* - *C. neoformans* var. *neoformans*), ficaria representado por *C. neoformans* x *C. deneoformans* híbrido. O complexo *C. gattii* (de acordo com a nova proposta), passaria a ser reconhecido com cinco espécies. O *C. gattii* (VGI/AFLP4; VGII/AFLP4; VGIII/AFLP5 e o VGIV/AFLP7; VGIV-VGIIIc/AFLP10) passaria a ser apresentado como *C. gattii*, *C. deuterogattii*, *C. bacillisporus*, *C. tetragattii* e *C. decagattii*, respectivamente. Já as formas híbridas entre o complexo *C. neoformans* e *C. gattii* seriam nomeadas como *C. deneoformans* x *C. gattii* híbrido (AFLP8), *C. neoformans* x *C. gattii* híbrido (AFLP9) e *C. neoformans* x *C. deuterogattii* híbrido (AFLP11), como mostra a **Tabela 2** (KWON-CHUNG et al., 2017).

Ferramentas moleculares tais como, reação de cadeia polimerase (PCR), polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP), tipagem de sequência multilocus (MLST) e sequenciamento de genoma inteiro (WGS), afirmam que o complexo *C. neoformans* e *C. gattii*, são geneticamente diversos e, baseado em quatro genes o *C. neoformans* e *C. deneoformans* se separam por 18,5 milhões de anos e se separam do *C. gattii* por 37 milhões de anos de diferença. O *C. gattii* e o *C. bacillisporus* separam-se por 9,5 milhões de anos atrás. No entanto, acredita-se que o tempo de divergência seja até mais antigo, uma vez que os cálculos baseados nos dados genômicos foram feitos entre 80 a 100 anos (HAGEN et al., 2017).

Tabela 2. Nova proposta para as espécies do Complexo *C. neoformans* e *C. gattii*.

Nome atual	Sorotipos	TM	AFLP	Nova proposta
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	A	VNI	AFLP1	<i>C. neoformans</i>
	A	VNII	AFLP1A/1B	<i>C. neoformans</i>
	A	VNB	AFLP1B	<i>C. neoformans</i>
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	AD ^{II}	VNIII	AFLP3	<i>C. neoformans</i> x <i>C. deneoformans</i> híbrido
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	D	VNIV	AFLP2	<i>C. deneoformans</i>
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	B	VGI	AFLP4	<i>C. gattii</i>
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	B e C	VGII	AFLP6	<i>C. deuterogattii</i>
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	C	VGIII	AFLP5	<i>C. bacillisporus</i>
<i>C. gattii</i>	B e C	VGIV	AFLP7	<i>C. tetragattii</i>
	B e C	VGIV/ VGIIIc	AFLP10	<i>C. decagattii</i>
DB híbrido			AFLP8	<i>C. deneoformans</i> x <i>C. gattii</i> híbrido
AB híbrido			AFLP9	<i>C. neoformans</i> x

			<i>C. gattii</i> híbrido
AB híbrido		AFLP11	<i>C. neoformans</i> x <i>C. deuterogattii</i> híbrido

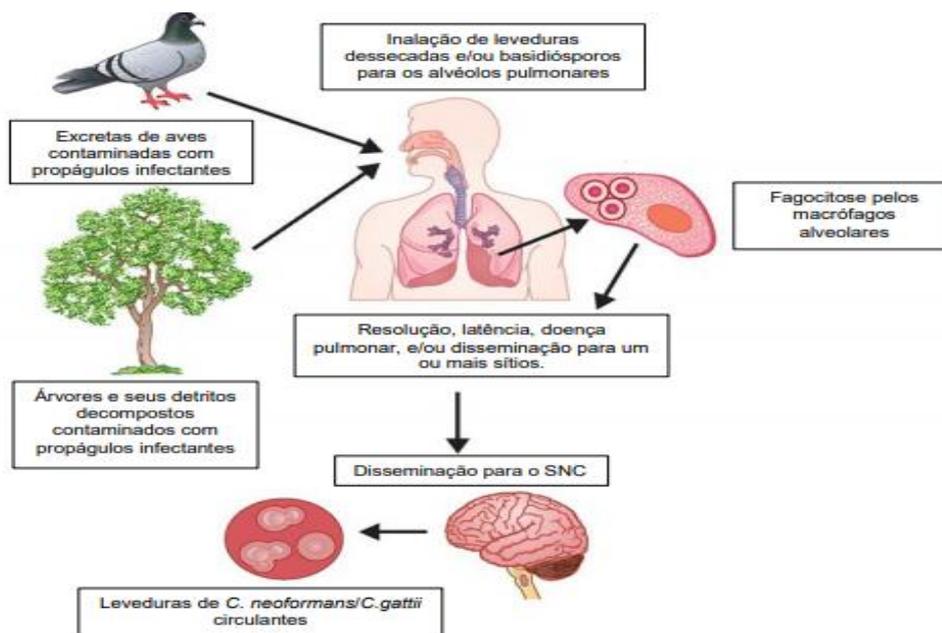
^π sorotipo híbrido; TM= tipo molecular; AFLP= Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado
A tabela foi construída e adaptada de acordo com os dados de Kwon-Chung et al., 2017.

De acordo com Kwon-Chung e colaboradores (2017), esta nova proposta oferece vantagens e desvantagens. A vantagem é que propiciaria um passo importante para a biodiversidade do complexo *Cryptococcus*, já que conforme seu estudo, as diferenças biológicas relevantes nem sempre são evidentes. Com relação as desvantagens: 1- o número estudado ainda é limitado (apenas 5% foram analisados pelo MLST); 2- Uma análise feita por Meyer et al (2011), mostrou que em 2.606 cepas, existem mais diversidade do que as sete cepas analisadas acima; 3- O número de espécies de *Cryptococcus* tende a aumentar o que torna esta proposta ainda instável; 4- é necessário mais estudos do genoma, pois, existem genomas até então não mapeados; 5- os modelos para o delineamento das espécies podem ainda não estarem apropriados; 6- a caracterização das espécies são complexas; 7- a utilização do termo “*gattii*” e “*neoformans*” ainda causa discordância.

3.4 A CRIPTOCOCOSE

A criptococose é uma doença sistêmica de importância mundial e que apresenta alta taxa de mortalidade, cerca de 70% após o diagnóstico, especialmente em países subdesenvolvidos. Esta infecção ocorre através da via respiratória superior mediante a inalação de propágulos fúngicos associados a fontes ambientais tais como: ar, água, solos, flores, folhas, madeira em decomposição, excretas de aves, em especial de pombos (*Columbia livia*) (**Figura 1**). Em pacientes imunocompetentes, o organismo é capaz de eliminar os propágulos fúngicos inalados. Por outro lado, em hospedeiros com a imunidade comprometida, estes propágulos fúngicos podem se instalar no pulmão e causar uma primo-infecção pulmonar ou se disseminar através da via hematogênica cruzando a barreira hematoencefálica, atingindo o sistema nervoso central, onde encontrarão altos níveis de oxigênio e nutrientes que são essenciais para sua multiplicação, e com isso, ocorrerá o desenvolvimento da meningoencefalite. A meningoencefalite é a manifestação clínica mais comum e a que mais evolui para casos fatais (SEVERO et al., 2009; TAKAHARA et al., 2013; PAULA et al., 2014; SOUTO et al., 2016; HAGEN et al., 2017; KWON-CHUNG et al, 2017).

Figura 1. Ciclo de infecção do gênero *Cryptococcus* sp.



Fonte: BROOKS et al., 2013.

Antigamente este gênero apresentava pouca importância clínica, porém o número de casos de criptococose cresceu drasticamente nos últimos 30 anos devido ao surgimento do HIV e com o desenvolvimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, bem como o uso de imunossupressores em pacientes transplantados e uso de quimioterápicos ganhando grande importância a classe médica e de pesquisa (MACCLELLAND et al., 2013; ALMEIDA et al., 2014; EL FANE et al., 2015). Anualmente são relatados mais de um milhão de casos de criptococose, destes, cerca de 625.000 vão a óbito, sendo uma infecção altamente incidente em regiões onde a população convive com o HIV, principalmente aqueles que possuem níveis de linfócitos TCD₄ inferiores a 50 células/mm³ (EL FANE et al., 2015; KWON-CHUNG et al., 2017).

3.4.1 Epidemiologia

Sabe-se que a criptococose está relacionada a altos índices de morbidade e mortalidade em todo o mundo, afetando imunocompetentes ou imunocomprometidos, em especial com HIV, contudo, existem outras condições predisponentes tais como, tratamentos com imunossupressores, transplantes de órgãos, desordem linfoproliferativas e neoplasias (MITCHELL e PERFECT, 1995; PERFECT e CASADEVALL, 2002; PYRGOS et al., 2013).

Esta infecção pode acometer ambos os sexos, no entanto, no homem a prevalência é de 70% dos casos e nas mulheres de 30%, o motivo ainda não está claro, acredita-se que seja devido a influências hormonais, exposição ocupacionais ou até mesmo predisposição genética. A prevalência de faixa etária é variada, no entanto, o maior índice está entre 30 e 50 anos, porém, no Brasil tem aumentado o número de casos em crianças nos últimos anos, o que pode ser explicado pelo crescimento do número de crianças desnutridas ou imunocomprometidas. As estatísticas não apontam diferenças em relação a etnia (PYRGOS et al., 2013; PIZANI; SANTOS, 2017).

A criptococose é relatada principalmente em países em desenvolvimento, onde as terapias antirretrovirais são pouco disponíveis. Em contrapartida nos países desenvolvidos, as infecções oportunistas pelo HIV caíram drasticamente, contudo a terapia com imunossupressores para pacientes transplantados e quimioterapias aumentaram, o que também faz com que a população fique suscetível a infecções oportunistas como a criptococose, embora pacientes aparentemente saudáveis também estejam vulneráveis a esta infecção (PYRGOS et al., 2013).

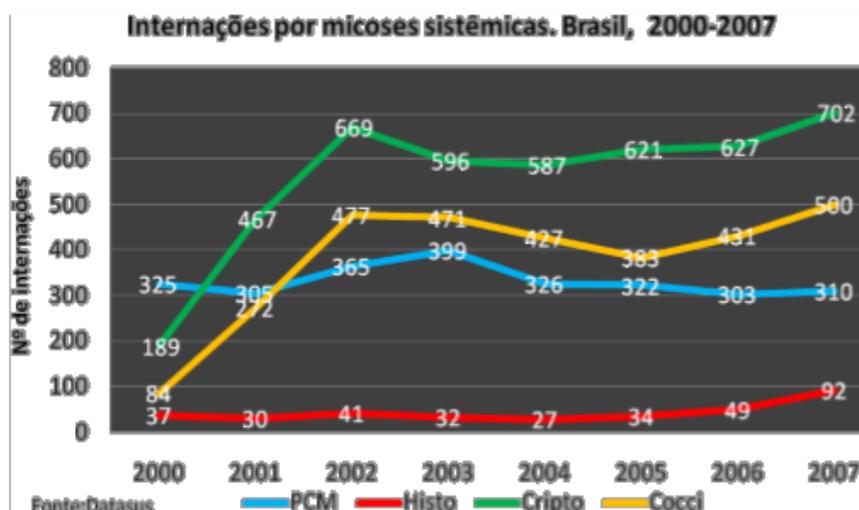
Os pacientes que sobrevivem a este tipo de infecção podem apresentar sequelas, tais como: déficit neurológico, surdez, cegueira, paralisia de nervos cranianos e déficit de memória, o que pode acarretar em terapêuticas prolongadas e até mesmo recaídas da doença (PYRGOS et al., 2013).

A incidência da criptococose cresceu na década de 1980 com o surgimento da AIDS/SIDA. Antes da epidemia da AIDS, a infecção criptocócica foi confirmada em menos de 500 pessoas mundialmente na década de 50. Em 1976, com o início da pandemia da AIDS, foram relatados 338 casos/por ano apenas nos Estados Unidos. Atualmente no mundo, ocorre aproximadamente 1 milhão de casos de criptococose tendo como resultado cerca de 600.000 a 625.000 óbitos por ano (BRASIL, 2012; PYRGOS et al., 2013).

No Brasil, é difícil avaliar os efeitos causados por esta micose sistêmica, pois a criptococose não é uma doença de notificação obrigatória no sistema de saúde brasileiro, sendo notificada como uma infecção oportunista, apenas quando ocorre em pacientes com AIDS, ou quando ocorrem surtos (BRASIL, 2012).

De acordo com a publicação do Departamento de Vigilância Epidemiológica do Brasil, 2012 (BRASIL, 2012), dentre as micoses sistêmicas/oportunistas no Brasil, a criptococose foi relatada como a principal em termos de internação. Estes dados foram apresentados pelo Sistema de Internação Hospitalar do Sistema Único de Saúde-SIH/SUS, de acordo com a **Figura 2**.

Figura 2. Número de internações por micoses sistêmicas no Brasil (2000-2007).

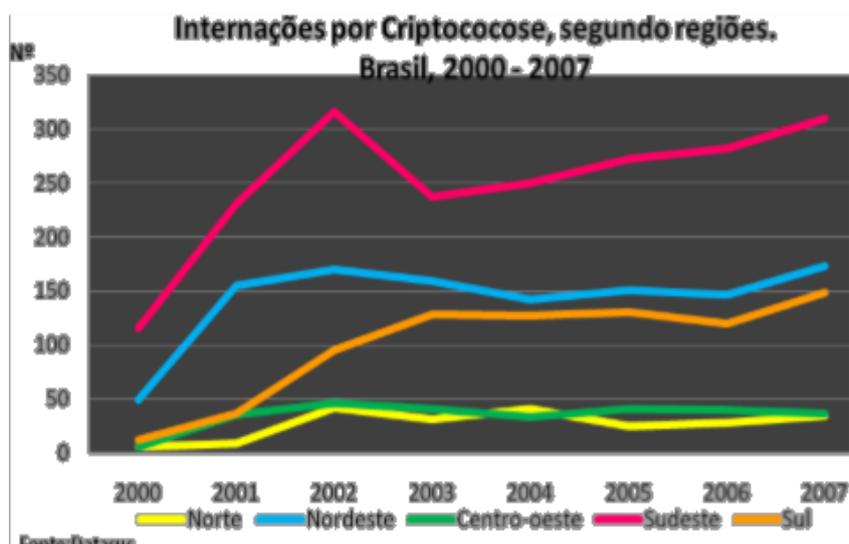


PCM: Paracoccidioidomicose; Histo: Histoplasmose; Cripto: Criptococose; Cocci: Coccidioidomicose
Fonte: Brasil, 2012.

O *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) é o agente que predomina na região Sul e Sudeste do Brasil, causando criptococose em pacientes com AIDS, em especial na população masculina, tendo cerca de 35-40% de casos letais. As infecções pelo *C. gattii* nestas regiões ocorrem de forma esporádica. O *C. neoformans* var. *grubii* sorotipo (A) VNI é o mais prevalente no mundo (82%) das infecções em HIV. O *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D), é responsável por cerca de 20-30% das infecções associadas ao HIV no Norte da Europa, em especial na França, Itália e Dinamarca, sendo menos frequente no resto do mundo. As infecções pelo *C. gattii* são mais comuns do que se pensa, e no Brasil, este agente é predominante nas regiões Norte e Nordeste, principalmente o *C. gattii* do genótipo VGII, afetando pacientes imunocompetentes de ambos os sexos, provocando cerca de 37 a 49% de letalidade (MARTINS et al., 2011; BRASIL, 2014). No restante do mundo, especialmente na Tailândia, Norte da Austrália, Nova Zelândia e Papua Nova Guiné, o genótipo dominante é o VGI. Na América Central e do Sul e no Sul da África, os genótipos principais são VGIII e VGIV, e estão mais associados a criptococose em pacientes HIV. Embora existam poucas informações sobre a incidência e impactos que esta doença causa mundialmente, estas informações revelam padrões marcantes da criptococose em todo o mundo (BRASIL, 2012; SLOAN et al, 2014; SHAHEEN et al., 2018).

De acordo com a **Figura 3**, no Brasil, a região Sudeste concentra o maior índice de internações pela criptococose (8 a 12%), seguido da região Nordeste.

Figura 3. Número de internações por criptococose (2000-2007), por regiões do Brasil



.Fonte: Brasil, 2012.

3.4.2 Patogenia

A patogenia da criptococose é determinada por três fatores importantes: 1- mecanismo de defesa do hospedeiro; 2- virulência da cepa; 3- tamanho do inóculo. A micose criptocócica é uma infecção de caráter oportunista, e caracteriza-se de forma localizada ou disseminada, que pode atingir desde os pulmões até o Sistema Nervoso Central causando meningoencefalite, e caso não seja tratada, é uniformemente fatal (PINTO, 2010; NAYAK et al., 2010; KWON-CHUNG et al., 2017; NAEL et al, 2017).

A infecção começa pela inalação de células de leveduras, dessecadas ou não, presentes no meio ambiente, ou possivelmente basidiósporos produzidos sexualmente, nos pulmões, considerada a via primária de infecção (KNOW-CHUNG et al., 2017). Em seguida, estes pequenos propágulos (1,5-3,5 μm de diâmetro) atingem as vias aéreas, ou seja, os pulmões, estas células de leveduras ao atingirem os pulmões entrarão em contato com os macrófagos alveolares. Os macrófagos agora ativados recrutam mais células de defesa por meio das citocinas e quimiocinas, promovem a captura destas células que serão destruídas ou que permanecerão em latência, tendo como resposta uma reação glanulomatosa. As infecções pulmonares são assintomáticas e autolimitadas quando em indivíduos imunocompetentes. Quando o indivíduo antes imunocompetente passa a sofrer alguma imunossupressão, estes propágulos uma vez em latência serão reativados, causando conseqüentemente a doença. Nos casos onde o imunocomprometido inala os propágulos fúngicos, estes, chegam aos pulmões causando uma infecção primária, no entanto, o organismo neste caso não consegue destruir e nem

conter as estruturas fúngicas, ocorrendo então a disseminação através da corrente sanguínea ou via linfática, chegando até o SNC, causando uma infecção secundária. A levedura tem tropismo pelo SNC, e nesta infecção é observado também o acometimento das meninges e a presença de lesões granulomatosas ou “criptococomas”, localizadas principalmente a nível do hemisfério cerebral, também podendo ser observado com menor frequência na medula espinhal. Este tropismo é atribuído as altas concentração de nutrientes assimiláveis pelo fungo, tais com: tiamina, ácido glutâmico, glutamina, dopamina, carboidratos, minerais e oxigênio presentes no líquido, além da falta de atividade do sistema imunológico, fatores importantes e responsáveis pela multiplicação fúngica e estabelecimento da meningoencefalite (SEVERO et al, 2009; TELLO et al., 2013; KNOW-CHUNG et al., 2014; KNOW-CHUNG et al., 2017).

O pulmão é o órgão mais acometido, tendo em sua grande maioria uma infecção de caráter assintomático. Quando sintomático, os sintomas são: febre, tosse seca ou com presença de escarro mucoide ou sanguinolento. Outros órgãos extrapulmonares podem também estar envolvidos, bem como: pele, olhos, miocárdio, ossos, articulações, próstata e trato urinário, tendo sinais e sintomas variados de acordo com o local de instalação da doença, como mostra a **Tabela 3**. Mas em regra geral, a infecção pelo SNC sob forma de meningoencefalite é ainda considerada a clínica mais grave da criptococose (ALMEIDA e MACHADO, 2014; KWON-CHUNG et al., 2014).

Tabela 3. Sinais e sintomas clínicos observados na infecção por *Cryptococcus* spp. de acordo com local da infecção no hospedeiro.

Local da infecção	Manifestações da criptococose	
	Sinais e sintomas iniciais	Sinais e sintomas avançados
Sistema Nervoso Central	Febre Mal estar Cefaleia constante Rigidez na nuca Vômito	Alterações visuais (acuidade, turvação, fotofobia, diplopia). Alterações mentais (delírio, desorientação, alucinações). Agitação
Pulmão	Febre Tosse mucoide Dispneia Suor noturno	Emagrecimento Fraqueza Insuficiência respiratória
Pele	Celulite Pápulas Abscessos	Nódulos cutâneos Lesões periarticulares

Fonte: Almeida e Machado (2014) modificado.

A criptococose cutânea pode ser primária ou secundária. A Criptococose Cutânea Primária (CCP) tem sido definida quando há ausência da disseminação da doença, e quando ocorre trauma prévio, como por exemplo: lesões através de corpos estranhos ou mordidas de animais. Já a Criptococose Cutânea Secundária (CCS), é observada em 10 a 20% dos casos e ocorre quando há a disseminação da doença através da via hematogênica (TELLO et al., 2013).

O maior percentual de paciente com CCP, foi isolado o *C. gattii* como agente causador, e nestes casos de infecção os pacientes são de faixa etária mais velha, e geralmente são imunocompetentes, apresentando lesões solitárias ou se restringe uma só região do corpo. Nos casos de CCS, as lesões são múltiplas e localizadas em várias regiões do corpo, especialmente cabeça e pescoço (TELLO et al., 2013).

As manifestações oculares em pacientes que tiveram neurocriptococose são relativamente comuns, essa manifestação é conhecida como neurooftalmológicas, sendo a papiledema (inchaço do disco óptico, causado por uma pressão intracraniana aumentada) a lesão mais frequente associada a meningite. Mas apenas 5% das meningites estão associadas a participações oculares, tendo a coroidite como um caso raro. A coroidite é uma lesão multifocal com manifestações clínicas variadas, que compromete a visão ou até mesmo a integridade global ocular, geralmente está associada ao papiledema (TELLO et al., 2013).

Alguns estudos relatam que a próstata pode ser considerada um local reservatório de leveduras de *Cryptococcus* e esta condição pode estar diretamente relacionada com as recidivas da infecção no gênero masculino (ALMEIDA e MACHADO; 2014).

3.4.3 Diagnóstico

O diagnóstico de criptococose é relativamente fácil, e realizado através de exames laboratoriais. O diagnóstico inclui técnicas como Exame Microscópico Direto (ED), cultura, histopatológico, sorologia, técnicas moleculares e exames por imagem (PERFERCT e BICANIC, 2015).

As amostras biológicas utilizadas no diagnóstico, são: líquido cefalorraquidiano, sangue, escarro, biópsia de tecido, Lavado Brônquico Alveolar (LBA), raspado de lesões cutâneas, secreção prostática, amostra de medula óssea e urina (ALMEIDA e MACHADO, 2014).

O ED é realizado por meio de um contraste conhecido como tinta nanquim, tinta da china ou nigrosina, que permite a visualização da estrutura arredondada, ou seja, a cápsula que é uma estrutura presente e característica do Complexo *Cryptococcus* sp.

Esta técnica em alguns casos pode ser feita com Hidróxido de Potássio (KOH) a 20% em amostras como escarro, LBA, secreção de medula óssea entre outros, bem como à fresco, ou seja, sem contraste ou clarificação, no entanto, antes da preparação da lâmina para o ED, o LCR, LBA, e urina devem ser previamente centrifugadas, tendo como objetivo concentrar no sedimento a forma somática do fungo. O ED é uma técnica simples e de baixo custo que apresenta até 95% de sensibilidade em caso de meningite criptocócica (SEVERO et al., 2009; ALMEIDA e MACHADO, 2014; PERFECT, 2014).

O meio de cultivo mais utilizado para o isolamento do *C. neoformans* é o Agar Sabouraud Dextrose (ASD) acrescido de cloranfenicol, no qual se inocula o material biológico a ser analisado. Após a inoculação este meio é colocado entre 25°C a 37°C por 72 horas, tendo como temperatura ótima entre 30 a 35°C e observa se houve o crescimento de colônias de aspecto mucóide com coloração de branco a creme (BICANIC e HARRISON, 2005; ALMEIDA E MACHADO, 2014).

No histopatológico é possível visualizar as estruturas fúngicas pertencentes ao Complexo de *C. neoformans*, por meio de corantes histopatológicos, tais como: Hematoxilina Eosina (HE), coloração de prata de Metenamina de Gomori (GMS), coloração com ácido periódico de Schiff, mucicarmim de Mayer e o Fontana-Masson. O HE avalia a reação tecidual, a coloração de prata é a mais sensível e cora de negro a parede celular que é visualizada sobre um fundo verde-claro, o mucicarmim é importante para diferenciar *Cryptococcus* spp. de outros fungos de estruturas semelhantes, visto que esta coloração tem como objetivo tingir a cápsula de vermelho; já o Fontana-Masson cora a melanina fúngica de marrom-avermelhado (BICANIC e HARRISON, 2005; GAZZONI et al., 2008).

Os testes sorológicos são realizados através da imunofluorescência ou soromicologia. A técnica da imunofluorescência é baseada na formação de um conjugado de anticorpos fluorescentes específicos para antígenos capsulares, no entanto é uma técnica restrita. Já a soromicologia é baseada pela detecção de antígeno presente na cápsula polissacarídica de *Cryptococcus* spp. conhecida como método de aglutinação em látex, o qual é um teste sorológico considerado rápido, simples e que apresenta cerca de 95% de sensibilidade e de 93-100% de especificidade em comparação ao teste mencionado anteriormente. O diagnóstico sorológico para criptococose pode ser realizado em LCR, soro, urina e LBA. Esta técnica pode apresentar reação falso-positivo em casos de fator reumatoide e em infecções por *Trichosporon beigellii*, ou reação falso-negativo em cepas que apresentam ausência de cápsula polissacarídica. Em casos de pacientes assintomáticos infectados pelo HIV, o teste de sorologia identifica a criptococose

precocemente, o que é de grande importância para o início do tratamento (BICANIC e HARRISON, 2005; GAZZONI et al., 2008; TELLO et al., 2013).

Técnicas moleculares podem ser utilizadas para o diagnóstico de criptococose através do líquido, sangue, secreções, biópsias, aspirado broncoalveolar e urina, no entanto, apesar de ser uma técnica específica e sensível por ser uma técnica de alto custo, sua aplicabilidade acaba sendo limitada para o diagnóstico clínico devido seu alto custo (Backes et al., 2016).

Os exames de imagem tais como: Raio-X, tomografia computadorizada e ressonância magnética são essenciais para casos que apresentam complicação. No Raio-x é possível observar nódulos pulmonares únicos ou múltiplos em pacientes imunocompetentes ou com HIV. Na tomografia, pode ser observado realce meníngeo, como também nódulos únicos ou múltiplos (criptococoma), edema ou hidrocefalia. Já na ressonância se tem uma sensibilidade maior quanto ao exame, pois é possível a visualização nodular dentro do parênquima cerebral, meninges, gânglios de base e encéfalo. Nos pacientes com HIV e apresentando a síndrome de imunodeficiência humana, é observado frequentemente a atrofia cortical podendo haver também nesses casos outras patologias existentes (BICANIC e HARRISON, 2005).

3.4.4 Identificação

3.4.4.1 Identificação Clássica

A identificação clássica é realizada a partir da cultura de *Cryptococcus* sp. que consiste em testes bioquímicos, que são úteis na diferenciação entre as duas espécies *C. neoformans* e *C. gattii*. O teste pode ser realizado através da assimilação em meio L-Canavanina-Glicina-Azul De Bromotimol (CGB), onde, os sorotipos B e C (*C. gattii*), crescem no meio com canavanina, utilizando a glicina e alterando o pH do meio levando a mudança de cor quando positivo do amarelo-esverdeado para azul cobalto, já os sorotipos A, D e AD (*C. neoformans*), não produzem alteração na cor do meio (ALMEIDA e MACHADO, 2014; BACKES et al., 2016).

Pode-se utilizar também o àgar Christensen ureia para confirmação, onde a amostra é inoculada no àgar e incubada a 30°C por sete dias. A diferenciação se dá pela alteração da cor do meio, do amarelo-incolor (cor original) para rosa, significando que houve hidrólise da uréia, positivando para *C. neoformans* (ALMEIDA e MACHADO, 2014; BACKES et al., 2016).

Há um meio nutricional conhecido como fenoxidase (lacase) ou àgar Niger, onde o *C. neoformans* e *C. gattii* são capazes de produzir melanina a partir de substratos fenólicos apresentando coloração marrom ou negra (ALMEIDA e MACHADO, 2014; BACKES et al., 2016).

3.4.4.2 Identificação proteômica: MALDI-TOF MS

Atualmente, a ionização de proteínas por dissociação a laser assistida por matriz e sua separação por tempo voo em espectrômetro de massas (MALDI-TOF MS), tem demonstrado ser uma ferramenta rápida e confiável para a identificação fúngica (fungos filamentosos e leveduras), incluindo espécies de *Cryptococcus* na clínica laboratorial, podendo substituir alguns métodos fenotípicos que demandam mais tempo para identificação, além de proporcionar uma alternativa para técnicas moleculares dependiosas e laboriosas (TARUMOTO et al., 2016; TOMAZ et al., 2016).

Kwon-chung e colaboradores (2017), ao questionarem a técnica para separar as novas espécies das espécies híbridas, só consideram que a identificação é confiável quando o valor do score é igual ou superior 1.700. Esse score é reconhecido e representado pela cor amarela em relatórios de identificação do fabricante alemão Bruker Daltonics Inc. (Bremen, Alemanha). Os equipamentos da linha flex (Microflex, Autoflex e Ultraflex, Bruker) apresentam em sua configuração, quatro categorias de acordo com os intervalos de score, sendo estes: 1- é exibido com score entre 0.000-1.699, representada pela cor vermelha, e significa que não foi possível a identificação; 2- exibe o score entre 1.700-1.999, representada pela cor amarela, sugerindo uma provável identificação a nível de gênero; 3- revela score entre 2.000-2.299 apresentando cor verde, informando que o gênero foi indentificado com sua possível espécie; 4- exibe score entre 2.300-3.000, revelando a identificação de gênero e espécie (HAGEN et al., 2017).

3.4.4.3 Caracterização molecular

O complexo *Cryptococcus neoformans*, atualmente, pode ser identificado e diferenciado por meio de análises moleculares, baseado em sequências específicas de genes. Entre as técnicas moleculares estão: a hibridização, que foi a técnica pioneira na identificação molecular de fungos; a PCR que é técnica predominante até hoje e muito útil para o diagnóstico da criptococose; e algumas técnicas atuais, tais como: a AFLP (análise do polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado); a RFLP (análise do

polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição) dos genes URA5 E PLB1; MLST (tipagem de sequência *multilocus*) que utiliza sete genes conservados: CAP59, GPD1, LAC1, PLB1, SOD1, URA5 E IGS1; e o PCR baseada em elementos repetitivos (Rep-PCR) que abarca dois elementos, o BOX-PCR e o ERIC-PCR. (TELLO et al., 2013; BILUNG et al., 2018).

3.4.4.3.1 Caracterização molecular: PCR baseado em elementos repetitivos (Rep-PCR)

A PCR fundamentada em elementos repetitivos (Rep-PCR), vem sendo muito atualizada para estudar padrões peculiares de cepas obtidos por meio de elementos repetitivos do DNA presentes no genoma bacteriano. Há dois elementos repetitivos utilizados para tipagem moleculares; os elementos BOX e o Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) (BULING et al., 2018).

Os elementos BOX são elementos repetitivos em mosaicos compostos por diferentes combinações de três sequências de subunidades, tais como: box A, box B e box C, apresentando 59, 45 e 50 nucleotídeos de comprimento, respectivamente (BULING et al., 2018).

O ERIC-PCR é uma das mais promissoras técnicas, pois é método baseado na amplificação de DNA genômico, no qual possui 126 bp de comprimento com uma repetição central invertida altamente conservada, e está situado em regiões transcritas não codificantes do cromossomo. As sequências ERIC são políndromos imperfeitos, e foram descritas pela primeira vez em *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, e em outros membros, bem como *Enterobacteriaceae* e *Vibrio cholerae*, logo, também vem sendo utilizada na caracterização de fungos, plantas, sereves vertebrados e invertebrado (SANTOS et al., 2020). A sequência de nucleotídeos do gene 26S rRNA bacteriano apresentou alta homologia com sequências de espécies de *Cryptococcus*, sendo assim, as comparações de impressões genéticas vêm usando os mesmos marcadores (DEHGHAN; RAHIMIAN, 2016).

Esta técnica permite uma tipagem simplificada para um número amplo e progressivo em expansão de organismo, torna-o como um método oportuno para epidemiologia hospitalar ou epidemiologia localizada (BAKHSHI et al., 2018; BULING et al, 2018),

A Rep-PCR possui vantagens sobre outros métodos de tipagem moleculares, que é possuir a capacidade de diferenciar cepas bacterianas intimamente relacionadas, bem como, ser um método simples, rápido, barato e confiável (BULING et al., 2018).

3.4.5 Tratamento

O tratamento da criptococose é realizado de acordo com a imunidade e manifestações clínicas do paciente, e deve ser iniciado logo após a confirmação da infecção fúngica, logo, é dividido pelos pesquisadores em três fases: fase de indução, consolidação e de manutenção. A fase de indução tem por finalidade negativar ou reduzir a carga fúngica, que inclui um período de aproximadamente seis a doze meses para infecção pulmonar, e de duas a dez semanas para a disseminada (Pizani; Santos, 2017). Após o período tratamento, inicia-se a fase de consolidação, que tem como objetivo o alcance de pelo menos dois resultados negativos para criptococose e obter a normalização dos parâmetros clínicos-laboratoriais por no mínimo oito semanas. A partir desse resultado ocorre a mudança da consolidação para a fase de manutenção, que consiste na terapia profilática, onde o indivíduo irá receber doses antifúngicas, por no mínimo 1 ano, variando de acordo com o estado imunológico do paciente (SATIE-KON et al., 2008; ALMEIDA e MACHADO, 2014; PIZANI; SANTOS, 2017; FHEMIG., 2019; WHITNEY et al., 2019).

Os antifúngicos mais utilizados para o tratamento da criptococose são: anfotericina B (Anf B), 5-fluocitosina (5FC), fluconazol (FLC), itraconazol, voriconazol e posaconazol (ESPINEL-INGROFF et al., 2012; ALMEIDA e MACHADO, 2014).

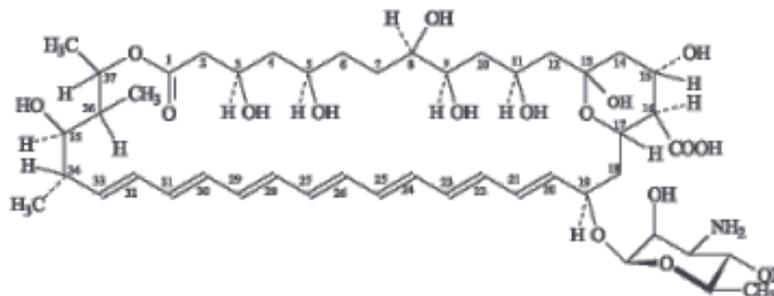
As diferentes variações de anfotericina B, são indicados como tratamento inicial para os casos de criptococose disseminadas, já os azólicos: fluconazol, itraconazol e voriconazol, não são indicados para tratamentos iniciais em pacientes HIV com infecção disseminada (ESPINEL-INGROFF et al., 2012; ALMEIDA e MACHADO, 2014).

3.4.5.1 Anfotericina B

A anfotericina B é um fármaco fungicida e fungistático da classe dos polienos, produzido por uma bactéria *Streptomyces nodosus*, que foi isolado aproximadamente em 1955, e desde sua descoberta é utilizado para tratamento de infecções sistêmicas, especialmente a criptococose. O nome anfotericina vem da característica anfotérica, como pode ser visto na **Figura 4**. Esta droga apresenta-se de quatro formas: uma formulação ativa; anfotericina B desoxicolato (d-AmB) e três formulações lipídicas; anfotericina B lipossomal (L-AmB), anfotericina em dispersão coloidal (ABCD) e a anfotericina em complexo lipídico (ABLC), sendo insolúvel a maioria dos solventes, ou seja, se trata de uma molécula anfipática (possui uma região hidríflica e outra

hidrofóbica), que tem sua solubilidade adquirida através do dimetilsulfóxido (DMSO) (FILIPPIN et al., 2006; KWON-CHUNG et al., 2014; FALCI E PASQUALOTTO, 2015).

Figura 4: Estrutura química da anfotericina B



Fonte: FILIPPIN et al., 2006.

A anfotericina B desoxicolato, foi considerada como sendo “o padrão ouro” por muitos anos no tratamento da criptococose. No entanto, por apresentar efeitos adversos como, nefrotoxicidade, sendo o principal, bem como outros: reações agudas as infusões, anemia, neutropenia, plaquetopenia e alterações hepáticas, sendo então substituída pelas formulações lipídicas da anfotericina B com o passar dos anos, pois as “novas formulações” estariam apresentando maior eficácia e menor toxicidade (FALCI e PASQUALOTTO, 2015).

As formulações lipídicas disponíveis no mercado são: Ambisome (L-AmB), Abelcet (ABLC) e a Amphotec ou Amphocil (ABCD), destas, apenas a L-AmB e ABLC estão disponíveis no mercado brasileiro para utilização na clínica médica (FALCI e PASQUALOTTO, 2015).

A L-AmB é composta por fosfatidilcolina de soja hidrogenada, distearoil fosfatidilglicerol e colesterol. Os componentes utilizados para a formulação desta droga apresentam altas temperaturas de transição e foram utilizadas por apresentarem estabilidade a 37°C. O colesterol por sua vez, confere mais estabilidade a formulação para que a AmB se mantenha dentro da bicamada de lipossomos. Sendo assim, os lipossomos contendo AmB ao entrarem em contato com as células fúngicas, tem sua matriz lipossômica degradada liberando AmB, e está ao ser liberada liga-se ao ergosterol da membrana celular fúngica, acarretando na destruição fúngica (FALCI e PASQUALOTTO, 2015).

A L-AmB apresenta nefrotoxicidade reduzida, pois tem afinidade por formulações lipídicas de alta afinidade (HDL) e de baixa afinidade (LDL), estas afinidades promovem captações reticuloendotelial que apresentam baixas expressões no tecido renal,

contribuindo para a redução d nefrototoxicidade e melhor índice terapêutico quando comparado ao d-AmB FALCI e PASQUALOTTO, 2015).

A ABCD e a ABLC apresentam parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos diferentes. A ABLC é absorvida rapidamente pelos macrófagos, alcançando um pico sérico maior do que o ABCD. Ambas as drogas apresentam mesmo espectro de atividade, todavia, são administradas em dose diferentes devido a toxicidade relacionada a ABCD, onde a dose não pode ultrapassar de 3-4mg/kg/dia (NOONEY et al., 2005; VALDÉS et al., 2005; HAMILL, 2013).

O mecanimos de ação da Anf B é o mesmo dos outros polienos. Este fármaco interage com o ergosterol, constituinte da parede celular fúngica, desencadeando a formação de poros através de membranas lipídicas, alterando assim, a permeabilidade de componentes essenciais para sobrevivência fúngica, em especial íons de potássio, acarretando na morte celular do fungo (FILIPPIN et al., 2006; CHEN et al., 2015).

A utilização da Anf B é indicada em casos graves com envolvimento do SNC (neurocriptococose), e para pacientes infectados com HIV. A Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza a dose de 0,7 a 1 mg/kg/dia em associação com 5-fluocitosina na dose de 100 mg/kg/dia, dividido em quatro doses, por um ciclo de duas semanas. Caso o 5FC não esteja disponível, este pode ser substituído pelo fluconazol na dose 400 mg/dia. Mas é necessário considerar os efeitos de toxicidade causados por estes antifúngicos (ALMEIDA e MACHADO, 2014; PERFECT e BICANIC, 2015; SMITH et al., 2015; WHITNEY et al, 2019).

Após a fase de indução, inicia-se a fase de consolidação com fluconazol na dose de 400 mg/dia/via oral por cerca de oito a doze semanas, em seguida a de manutenção com 200 mg/dia/via oral entre um período de 6 a 12 meses, a depender do estado clínico do paciente, em especial para os casos de pacientes com HIV, o fluconazol deve ser mantido até o restabelecimento do TCD₄⁺ em pelo menos 350 células/mm³ (ALMEIDA e MACHADO, 2014; WHITNEY et al, 2019).

A nefrotoxicidade é um fator levado em consideração nas terapias antifúngicas entre a ABCD e ABLC. Os efeitos adversos mais sérios são causados pelo ABCD, visto que este fármaco pode levar o paciente a desenvolver lesões renais, além de febre, tremores, calafrios, náuseas, vômitos e dores de cabeça. O ABLC apresenta reações e toxicidade menor sendo recomendada para tratamento em pacientes que apresentam função renal prejudicada, no entanto, seus efeitos colaterais são mais cardiovasculares, hepáticos e respiratórios (ERIKSON et al, 2001; DERAY et a., 2002; FILIPPIN et al., 2006; ALMEIDA e MACHADO, 2014).

3.4.5.2 5-flucitosina

A flucitosina foi inicialmente desenvolvida em 1957 para tratamento contra o câncer, no entanto, não foi totalmente eficaz (Filippin et al., 2006; Loyse et al., 2013). Estudos posteriores constataram que se tratava de uma molécula solúvel em água, e que penetrava facilmente em todos os tecidos, inclusive no líquido cefalorraquidiano (LCR) (FILIPPIN et al., 2006).

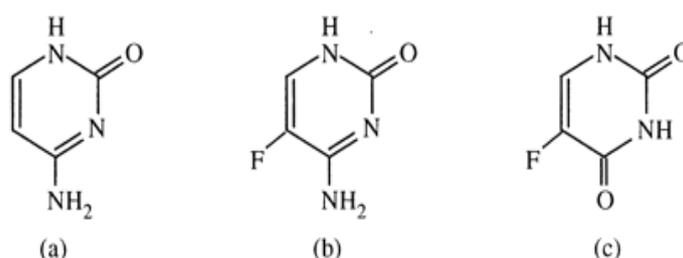
Em 1963, estudos realizados em camundongos mostraram que a flucitosina apresentava efeito contra *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, e em 1968, a 5-FC foi utilizada pela primeira vez para tratamento de candidemia e criptococose. Esta molécula também apresenta atividade contra cromomicose e alguns protozoários (LOYSE et al., 2013).

A flucitosina é um análogo fluorado sintético da citosina (**Figura 5a**), tem como mecanismo de atividade antifúngica a conversão de flucitosina em 5-fluorouracil (5-FU) no citosol da célula fúngica suscetível (**Figura 5b e 5c**, respectivamente). O 5-FU é um antimetabólico potente que causa modificações do RNA e inibe a síntese de DNA da célula fúngica (VERMES et al., 2000; LOYSE et al., 2013).

A flucitosina mostrava ser a droga ideal, pois possuía ação exclusivamente nos ácidos nucleicos da célula fúngica. No entanto, verificaram que esta molécula ao exceder 100mg/L nos níveis séricos de concentração no paciente, estavam causando toxicidade hematológica e gastrointestinal (LOYSE et al., 2013).

Estudos realizados em murinos, constataram que a combinação terapêutica entre AmB (0,5 mg/ Kg/dia) e flucitosina (100 mg/kg/dia) se mostrava mais eficaz do que quando administrado isoladamente (LOYSE et al., 2013). No entanto, a flucitosina ainda não está comercialmente disponível no mercado brasileiro (KNEALE et al., 2016).

Figura 5. Estrutura química da (a) citosina; (b) flucitosina (c) 5-fluorouracil



Fonte: VERMES et al., 2000.

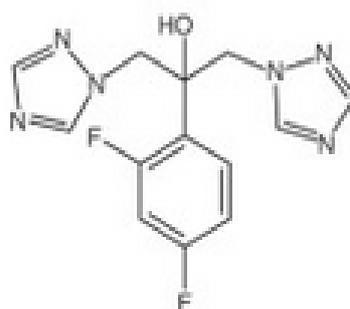
3.4.5.3 Azólicos

Os primeiros azólicos foram descobertos na década de 60. São moléculas totalmente sintéticas e são os antifúngicos de maior expansão territorial. São classificados em imidazóis e triazóis. Os azólicos são fungistáticos e apresentam amplo espectro contra a maioria dos fungos filamentosos e leveduras (MAZU et al., 2016).

Os triazóis são mais recentes que os imidazóis, menos tóxicos e mais eficazes, sendo representado por; fluconazol, itraconazol, isavuconazol, ravuconazol, posaconazol, voriconazol e terconazo (MAZU et al., 2016). O fluconazol, itraconazol e voriconazol não são recomendados para tratamento de infecções iniciais em portadores de HIV com criptococose disseminada (TELLO et al., 2013)

O fluconazol é um fármaco fungistático da classe dos triazólicos (**Figura 6**), que atua assim como os demais azólicos, inibindo a 14- α -dimetilase e com isso impede que a célula produza ergosterol para a membrana celular do fungo. Este antifúngico é ideal para infecções leves sem comprometimento do SNC, sendo nestes casos administrados por via oral 400 mg/dia durante 6 a 12 semanas. O FLC é padrão também para os casos de consolidação e manutenção. A OMS recomenda que se utilize o fluconazol em casos que o paciente apresente positividade para antígeno criptocócico mesmo sendo assintomático, principalmente para aqueles com TCD4⁺ menor que 100 células/ mm³, como forma preventiva (WHO, 2011). Em locais com indisponibilidade de AmB, se utiliza o fluconazol por dez semanas em elevadas doses (800-1.200 mg/dia). No entanto, alguns estudos relatam que terapias preventivas com o fluconazol em baixa dose por várias semanas, pode levar a seleção de cepas e conseqüentemente a resistência antifúngica (TELLO et al., 2013; SMITH et al., 2015; GROSSMAN e CASADEVALL, 2017).

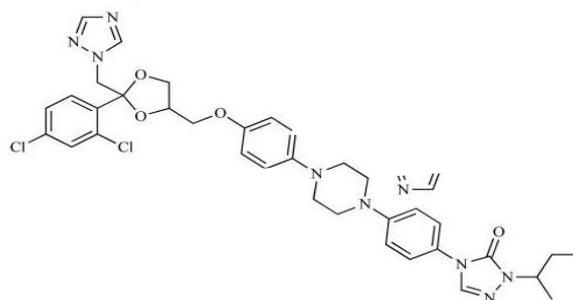
Figura 6. Estrutura química do fluconazol.



Fonte: ROEMER e KRYNAS, 2014.

O itraconazol é um imidazol derivado dos azóis (**Figura 7**), e pode ser utilizado no tratamento de micoses sistêmicas em casos leves, como criptococose pulmonar onde recomenda-se uma administração entre 200-400 mg/dia/via oral por um período de dois a três meses, ou até quando o paciente apresentar resposta de cura. Este fármaco pode ser utilizado também para os pacientes que apresentam intolerância ao fluconazol, porém, em ambos os casos, este antifúngico é menos eficaz quando administrado sozinho (SATISHCHANDRA et al., 2007; TELLO et al., 2013; MACHADO, 2014).

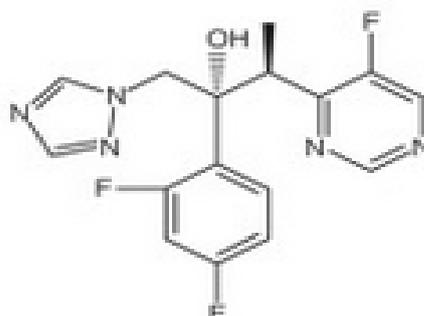
Figura 7. Estrutura química do itraconazol



Fonte: MAZU et al., 2016

O voriconazol é um fungicida derivado sinteticamente do fluconazol (**Figura 8**), no entanto possui um espectro mais amplo (BELLMANN e SMUSKIEWICZ, 2017). Seu mecanismo de ação ocorre através da inibição do 14- α -lanosterol dependente do citocromo P450, que é um componente essencial para a síntese do ergosterol da membrana fúngica. Este fármaco demonstra importante atividade antifúngica contra *C. neoformans*, pois tem a capacidade de penetração no SNC, sobretudo em hospedeiros normais, no entanto, a experiência terapêutica em casos de criptococose ainda é um pouco relatada (DIUN et al, 2004; ROEMER e KRYNAS, 2014; MOURAD e PERFECT, 2018).

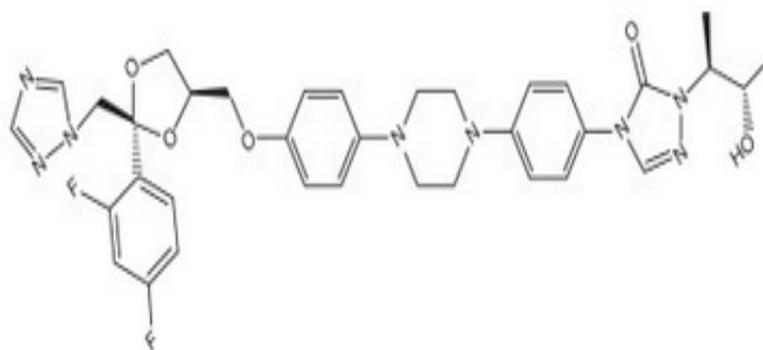
Figura 8: Estrutura química do voriconazol.



Fonte: ROEMER e KRYNAS, 2014.

Posaconazol é um antifúngico recente, foi apresentado pela primeira vez em 1995, na reunião de Conferência Interscience sobre Agentes Antimicrobianos e Quimioterapia (ICAAC). O posaconazol pertencente aos triazólicos de segunda geração (**Figura 9**), que vem apresentando excelentes atividades antifúngicas no tratamento de micoses invasivas. De acordo alguns estudos com criptococose, este fármaco em testes *in vitro* tem apresentado excelentes resultados, no entanto, foi observado dificuldade de penetração no SNC, o que limita seu uso contra *C. neoformans* (TELLO et al., 2013; MOURAD e PERFECT, 2018).

Figura 9: Estrutura química do posaconazol.



Fonte: ROEMER e KRYNAS, 2014

3.4.5.4 Resistência antifúngica

A resistência aos medicamentos é um fenômeno emergente e ubíquo. O termo “resistência” refere-se a redução da sensibilidade a um agente antifúngico, quando testado *in vitro* e comparados com outros isolados da mesma espécie. Tais testes *in vitro* são realizados através de métodos desenvolvidos e padronizados por Institutos de Referência Mundial, como *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) e o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), e neles já existem Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) e pontos de cortes clínicos espécie-específicos estabelecidos com seus respectivos antifúngicos (PERLIN et al, 2017; ROBBINS et al., 2017).

A evolução dos fungos e o uso empírico e irracional dos antifúngicos, pode proporcionar a redução dos efeitos inibitórios da droga, conferindo-lhe resistência antifúngica (COWEN et al., 2015; ROBBINS et al., 2017). A resistência adquirida varia muito por classe de antifúngicos, por exemplo, a exposição repetida as drogas antifúngicas pode desenvolvimento mutações dentro das células, além de agirem como

agente seletivo, acarretando na resistência aos antifúngicos, o que restringe as opções terapêuticas (GULLO et al., 2013). De acordo com KWON-CHUNG (2014), há vários estudos relatando a resistência do *Cryptococcus* spp. contra algumas drogas antifúngicas.

A resistência a Anf B é considerada rara, embora possa ocorrer durante o curso do tratamento clínico, e geralmente relacionado a composição do ergosterol na membrana fúngica, que pode ser pelo aumento da atividade da catalase ou falha na biossíntese do ergosterol (GULLO et al., 2013; Coelho e Casadevall, 2016). Já a resistência ao 5-flucitosina é tão comum que impede seu uso como monoterapia (COELHO e CASADEVALL, 2016).

A resistência aos azólicos é mais frequente devido à sua natureza fungistática, especialmente ao fluconazol quando se trata de pacientes com AIDS, que pode se dar devido a fase de manutenção terapêutica a longo prazo para a população sobrevivente (KWON-CHUNG et al., 2014; ROBBINS et al., 2017).

O mecanismos de resistência antifúngica aos azólicos: redução do acúmulo de antifúngicos nos fungos; células associadas ao aumento da expressão do gene que codificam proteínas; superprodução enzimática; implementação de vias metabólicas alternativas ou produção da molécula da enzima-alvo (ESPINEL-INGROFF, 2008; GULLO et al., 2013).

O mecanismo de resistência mais prevalente envolvendo os azólicos é a alteração ou superexposição do gene alvo (ER11) à droga, impedindo a ligação do fármaco a proteína (GULLO et al., 2013; KWON-CHUNG et al., 2014). Outro mecanismo conhecido é a regulação positiva de transportadores de multidrogas. Os transportadores de cassetes de ligação ao ATP (ABC) Afr1, assim como o principal facilitador Mdr1, estão envolvidos na resistência clínica ao azólicos. O Mdr1 atua escapando das defesas do hospedeiro de forma intrínseca, através do efluxo de peptídeos antimicrobianos, por exemplo, a histamina (RAVIE et al., 2018).

O *C. neoformans*, *C. gattii* e *Candida albicans*, são as únicas leveduras capazes de originar a progênie com fenótipos de resistência heterogênea aos azólicos (ROBBINS et al., 2017). Este fenômeno conhecido como heterorresistência, permite que na subpopulação (clones) destas leveduras ocorra uma adaptação a concentrações crescentes de azólicos de forma gradual (ROBBINS et al., 2017). Além disso, pode ocorrer uma superexpressão dos genes produtores de enzima-alvo, levando a célula fúngica a produzir ergosterol suficiente para formação e manutenção da parede celular fúngica, mesmo na presença do antifúngico azólico (SIONOV et al., 2010; SHAPIRO et al., 2011; KWON-CHUNG et al., 2014).

Nesse contexto de uso racional de antimicrobianos, testes de sensibilidade dos agentes etiológicos frente aos antifúngicos vem despertando muito interesse a comunidade científica e equipes médicas, devido ao aumento de casos de infecções fúngicas, aos poucos antifúngicos disponíveis, bem como a avaliação do potencial de novos compostos bioativos (BANERJEE e SHANNON, 2001).

3.4.5.5 Novas alternativas terapêuticas

As infecções fúngicas sistêmicas vem se mostrando crescente a cada ano, principalmente acometendo aqueles que se encontram em estado de saúde mais grave ou que apresentem alguma imunossupressão, e as opções terapêuticas tem se tornado cada vez mais limitadas para estes casos. Há no mercado poucas classes químicas representadas pelos antifúngicos; classes estas que incluem: polienos, azóis, alilaminas, flucitosina e equinocandinas. Sendo assim, se faz necessário uma bioprospecção com relação as moléculas naturais ou sintéticas na busca de novos protótipos antifúngicos (FORTÚN, 2011; GULLO, et al., 2013; COWEN et al. 2015).

O Brasil é composto por um enorme território, com uma grande diversidade climática e condições de solo, que favorece a exploração racional e sustentável de novos compostos com valor terapêutico (GULLO, et al., 2013).

De acordo com Zu e colaboradores (2012) em sua revisão de literatura entre 1991-2010, relatando novos medicamentos oriundos de produtos naturais aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Eles descobriram que de 126 novas drogas, 46 foram de origens naturais, e 14,5% foram de plantas que ainda não haviam sido exploradas. O estudo de 59 espécies de plantas, produziram 85 novas drogas, das quais 69,4% foram de moléculas sintéticas oriundas de produtos naturais. O estudo de novas opções terapêuticas a partir de produtos naturais ou moléculas já conhecidas, são de extrema relevância, pois possibilita aumentar o leque de opções terapêuticas, além de reduzir os efeitos tóxicos e indesejados dos “futuros” fármacos (GULLO et al., 2013).

Os derivados nitrotiofeno tiossemicarbazônicos são compostos heterocíclicos com fórmula C_4H_4S , pertencente a uma classe de substâncias que possuem como esqueleto químico fundamental o anel tiofeno, contendo um anel de cinco membros, podendo ser encontrado em produtos naturais como petróleo e carvão, farmacologicamente ativos, muitos dos quais estão sendo empregados em uso clínicos regulares (MISHRA et al., 2011).

Os derivados tiofênicos, e 2-amino- tiofênicos tem se revelado importantes intermediários sintéticos para a química medicinal, permitindo a obtenção de um grande número de compostos bioativos apresentando diversas aplicações médicas e biológicas (PUTEROVÁ et al., 2009).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, que tem por finalidade acompanhar as pesquisas envolvendo seres humanos, bem como preservar a integridade e dignidade dos indivíduos sujeito a pesquisa. Em atendimento à resolução CNS/MS Nº 466/12, a pesquisa obteve a aprovação através do parecer número 2.415.316 com o protocolo de submissão a plataforma Brasil CAAE 77503417.4.0000.5208.

4.2 TIPO E LOCAL DE ESTUDO

Trata-se de um estudo prospectivo e descritivo com coleta de dados realizadas a partir de prontuários médicos por 18 meses, para descrever as características clínico-epidemiológicas da doença e sócio-demográficas dos pacientes.

O local do estudo foi composto pelo Hospital Correia Picanço (HCP) e Hospital das Clínicas (HC). O HCP é administrado pela Secretária Estadual de Saúde do Pernambuco (SES-PE), sendo esta uma unidade de referência para tratamento de doenças infecto-contagiosas, especialmente AIDS e meningite, tendo em suas dependências 170 leitos, destes, 48 destinados para as doenças infecto-contagiosas. O HC por sua vez, é administrado pela Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (EBSERH), comportando 418 leitos, destes, 26 são destinados para Doenças Infecto-Parasitárias (DIP).

4.3 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS

Entre agosto de 2017 e dezembro de 2019, a coleta de amostras biológicas para a obtenção dos isolados clínicos deu-se por meio da coleta do líquido cefalorraquidiano (LCR), sangue (hemocultura) ou urina de pacientes atendidos nas unidades de saúde; Hospital das Clínicas (HC/UFPE) e Hospital Correia Picanço (HCP/PE), apresentando ou não sintomatologia para criptococose. As amostras biológicas, como LCR foram coletadas por infectologistas, que são os profissionais qualificados para este tipo de coleta.

As amostras oriundas do HC/UFPE, foram levadas para o laboratório de micologia médica, no Centro de Biociências da UFPE para serem imediatamente processadas. No entanto, do HCP, já eram obtidas as leveduras previamente isoladas. Para a realização

do diagnóstico micológico, foi utilizado o método padrão (exame direto e isolamento na cultura).

O exame microscópico direto para o diagnóstico da criptococose foi realizado da seguinte maneira: as amostras coletadas tanto de LCR como de urina foram centrifugadas (1500 a 2000g por 5 minutos), em seguida uma alíquota do sedimento foi colocada sobre lâmina e acrescido uma gota de tinta nanquim (tinta da china) com posterior montagem utilizando lamínula. Realizou-se a pesquisa microscópica, e paralelamente, foi realizado o semeio do material biológico em placas de Petri com agar Sabouraud dextrose (ASD) acrescido de 2 mL de cloranfenicol a 50mg/L, que foram incubadas em duplicata a 35 °C em atmosfera aeróbica por até 5 dias. Após o crescimento, foram realizadas análises micro e macroscópicas das culturas (Lacaz et al., 2002). As culturas que apresentaram colônias mucoides de coloração creme, confirmando a infecção por *Cryptococcus* sp. eram então transferidas para tubos de ensaio contendo (ASD) para posteriormente testes laboratoriais.

4.4 TESTE DE AGLUTINAÇÃO EM LÁTEX

Adicionalmente, foi realizado teste de aglutinação em látex em dois pacientes oriundos do HCP, este teste se deu por meio da urina dos pacientes avaliados.

O kit Teste do antígeno *Cryptococcus* látex (Thermo Fisher Scientific-Phadia Diagnósticos LTDA), é um teste de aglutinação simples e de triagem para a detecção qualitativa ou semi-quantitativa do antígeno polissacarídico capsular do *C. neoformans*. O princípio deste teste é baseado em partículas de látex sensibilizadas com anticorpos monoclonais IGM de murinos (camundongos). O antígeno capsular presente na amostra biológica do paciente interage com a partícula em látex sensibilizada produzindo aglutinação visível.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL CLÍNICO- DEMOGRÁFICO

Foram incluídos na pesquisa casos de pacientes com criptococose, residentes do estado do Pernambuco e atendidos nas duas unidades de saúde anteriormente citadas e que apresentaram positividade no exame direto e cultura para *C. neoformans* ou *C.gattii*.

Para critério de exclusão, foi levado em consideração pacientes residentes de outro estado e que não apresentaram positividade através do exame direto e/ou cultura.

O processamento se deu através de consultas dos livros de registros no Setor de Arquivo Médico (SAME), resgatado através do Sistema Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL). Foram coletadas as seguintes variáveis:

- a) Demográfico: sexo, idade, etnia, ocupação laboral, distribuição espacial e temporal dos casos;
- b) Condições clínicas: condição imunológicas, tempo de internação após início de sinais e sintomas, principal causa de admissão hospitalar, sinais e sintomas referidos e observados, manifestações clínicas, nível de consciência;
- c) Dados complementares: coinfeções (ex.: HIV) e complicações na internação;
- d) Exames laboratoriais: diagnóstico laboratorial (exame micológico), contagem de linfócitos TCD₄, contagem da carga viral;
- e) Tratamento e evolução: terapia antirretroviral, condutas terapêuticas realizadas e evolução clínica.

Durante todo o trabalho, foi mantida a confidencialidade sobre os dados e identidade do paciente. **(APÊNDICE H)**.

4.6 SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA *in vitro*

A metodologia utilizada para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos isolados fúngicos seguiu as condições descritas nos protocolos M27-A3 e M59-ED2 do *Clinical and Laboratory Standard Institute*, respectivamente (CLSI, 2008; CLSI, 2018).

O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), sem bicarbonato de sódio, com L-glutamina e vermelho fenol como indicador, tamponado com ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico (MOPS; 0,165 mol L⁻¹; Sigma-Aldrich, E.U.A.) e ajustados para pH 7,0 ± 0,1. Este meio foi esterilizado em filtro de membrana (Millipore®) de 0,22µ e armazenado a 4°C até o uso.

Para a realização do teste, foram utilizados os seguintes antifúngicos: anfotericina B e fluconazol comercialmente disponíveis, estes, foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO; Gibco, Minas Gerais, Brasil) e água destilada, respectivamente. Dez diferentes concentrações foram utilizadas, variando de 0,03 a 16 µg/mL⁻¹ para anfotericina B, e 0,125 a 64 µg/mL⁻¹ para fluconazol. Adicionalmente, foi testada uma molécula derivada do anel aromático tiofeno diluído em DMSO a uma concentração que varia de 0,125 a 64 µg/mL⁻¹.

Os isolados de *C.neoformans* foram repicados em ágar Sabouraud dextrose adicionado de clorafenicol a 50mg/mL e incubados a 35°C por 48 horas, e 24 horas para a ATCC 22019 (*C. parapsilosis*), cepa controle. Em seguida, as colônias foram suspensas em 5mL de solução salina (cloreto de sódio a 0,85%) previamente esterilizada, e agitadas por 15 segundos em vórtex. A densidade de suspensão celular foi ajustada através do espectrofotômetro a 530 nm e transmitância de 90% (0,5 na escala de McFarland) para obtenção de uma concentração final de $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ cels/mL.

Em placas de microtitulação de fundo chato com 96 poços (TPP, Trasadingen, Suíça) foram dispostos 100 μ de meio RPMI 1640, sendo dispersos nos 96 poços. Em seguida, foi disposto 100 μ l em toda a primeira coluna da substância a ser testada, onde na primeira coluna teríamos a maior concentração e na décima a menor concentração. As colunas 11 e 12, foram utilizadas como controle de crescimento e de esterilização, respectivamente. Posteriormente, 100 μ L do inóculo previamente preparado e padronizado, foi adicionado aos poços das colunas 1 a 11, sendo as microplacas incubadas a 35 °C por 72 horas (*C.neoformans*) e 24-48 horas para ATCC. As placas contendo as substâncias a serem testadas, foram preparadas separadas.

Após o período exigido para a incubação das microplacas, foram realizadas as leituras e então a determinação do CIM através da leitura visual. Para o fluconazol foi considerado a menor concentração com a redução $\geq 50\%$ de crescimento fúngico considerando o crescimento total do poço controle, para anfotericina B e a molécula de tiofeno, foi considerado o poço que possuía 100% de inibição em relação a controle.

4.7 IDENTIFICAÇÃO PROTEÔMICA POR MALDI-TOF/MS

Os isolados foram submetidos à análise direta por espectrometria de massa (MALDI-TOF; MALDI Autoflex III, BrukerDaltonics, Bremen, Germany), de acordo com Lima-Neto et al. (2014).

Para análise através do MALDI-TOF, foi necessário realizar 48h antes, repiques em meio Dextrose Peptona Extrato de Levedura (YEPD) dos isolados e mantê-los aerobicamente a 35°C. Após 48h, é realizada a extração proteica. Em tubos de eppendorf esterilizados e previamente identificados são adicionados os fragmentos de células dos isolados a serem analisados (cerca de 50 μ g), em seguida, é acrescido 300 μ l de água milli-Q® em cada tubo, posteriormente, adicionar 900 μ l de álcool absoluto, levar ao vortex, para lisar a parede fúngica, logo após centrifugar a 12.000g por 3 minutos, desprezar então o sobrenadante formado com a centrifugação e adicionar 50 μ l de ácido

fórmico a 70% e a mesma quantidade de acetonitrila, levar ao vortex novamente, e centrifugar novamente. Nesta última etapa de extração formará novamente o sobrenadante, onde este não será desprezado e sim utilizado para a análise. Para a análise, foi transferido 1,5µl do sobrenadante da extração na placa polimérica. Após a total evaporação do preparo líquido, foi adicionado 1,0 µL da solução matrix (75 mg/mL de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico[CHCA] em etanol/água/acetonitrila [1:1:1] com 0,03% de ácido trifluoroacético [TFA]) e em seguida foi realizada um levemente homogeneização. Cada amostra foi transferida em duplicata para testar a reprodutibilidade. Durante as análises todas as soluções foram previamente preparadas e estocadas a +5 °C (Putignani et al., 2001; Veen et al., 2010).

Os espectros para determinação do perfil protéico dos isolados foram obtidos através do laser Nd: YAG (neodymium-dopedyttriumaluminiumgarnet; Nd: Y3Al5O12) de 1064nm, onde a intensidade do laser foi ajustada ligeiramente acima do limiar para a produção de íons. Um kit protéico (proteincalibrationstandart I, BrukerDaltonics, Bilerica, MA, USA) com conhecidos valores de massa das proteínas, e foi usado para calibração. A variação de massa entre 2.000 a 20.000 Da foi registrado usando modo linear com pulso de 104 ns em uma voltagem de +20 kV. Espectros finais foram gerados através da soma de 20 tiros de laser acumulados por perfil e 50 perfis produzidos por amostra, levando a um total de 10.800 disparos de laser somados por espectro. A lista de picos obtidos foi exportada ao software Biotyper™ (Biotyper system, versão 3.0) onde as identificações finais foram alcançadas. A identificação através do software Biotyper™ foi baseada apenas na presença ou ausência de cada pico no espectro.

4.8 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR ATRAVÉS do ERIC-PCR

A extração de DNA dos isolados foi realizada previamente, de acordo com Sambrook & Russell, 2001, com algumas modificações.

Os isolados, após prévia extração de DNA, foram submetidos à tipagem molecular através de técnica de PCR repetitiva intergênica baseada em consenso (ERIC-PCR) para identificação do perfil clonal das cepas. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25µL por tubo, contendo: 100ng de DNA, 10pmol de primers (ERIC-1 [5'-ATGTAAGCTC CTGGGGATTAC-3']; ERIC-2 [5'AA GTAAGTGAAGTGGGGTGAGG-3']), Tampão 1x, trifosfato de desoxirribonucleotídeo 200µM, 1,5mM de MgCl₂ e 1U de polimerase Taq de DNA. Os parâmetros de amplificação utilizados no ERIC-PCR foram descritos por Duan et al., 2009.

Os produtos de PCR foram corados com azul esverdeado (LGC Biotecnologia - São Paulo), e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados para análise clonal (DUAN et al., 2009).

Foi construída uma matriz para os fragmentos polimórficos amplificados codificados em sistema binário, atribuindo-se (1) para presença e (0) para ausência de banda. Somente foram consideradas as bandas que não davam margens a dúvidas. Bandas muito fracas, de difícil resolução, não foram incluídas. Para análise dos dados, utilizou-se o Programa Past. A relação genética entre as amostras foi estimada pelo coeficiente de Jaccard, que gerou a matriz de relação genética. Esta análise viabilizou a construção de um dendograma que mostrou graficamente a relação genética entre as amostras.

4.9 ANÁLISE DE DADOS

As amostras estudadas foram tabuladas no programa Microsoft® Excel 2013 e os cálculos estatísticos foram realizados no software SPSS na versão 20.0 - *Statistical Package for the Social Science*, por meio de estatística descritiva e dos testes exatos de Fisher ou Qui-Quadrado de Pearson.

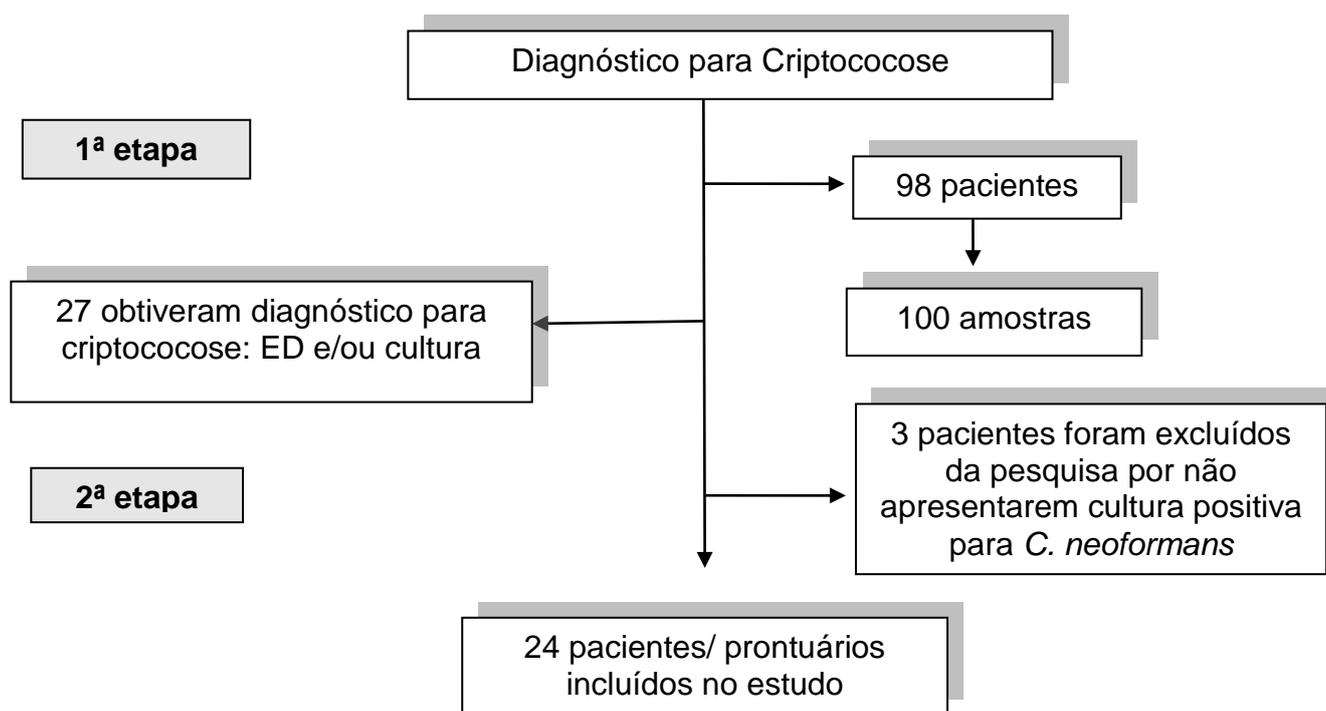
Os resultados foram apresentados em forma de tabelas ou gráficos, as frequências relativas (percentuais) e absolutas (N) das classes de cada variável qualitativa. Para as variáveis quantitativas serão utilizadas médias e medianas para resumir as informações, e desvio-padrão, mínimo e máximo para indicar a variabilidade dos dados.

Foram considerados estatisticamente significantes os resultados cujos níveis descritivos (valores de p) forem inferiores a 0,05.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Durante o período de agosto de 2017 a dezembro de 2019 foram incluídos na pesquisa 98 pacientes oriundos do Hospital das Clínicas (n=76) e do Hospital Correia Picanço (n=22), ambos localizados no Recife-Pernambuco com hipótese diagnóstica de criptococose. Destes, foram obtidas 100 amostras biológicas, que variaram entre LCR, urina e sangue. Dos 98 pacientes analisados, 27 (27,5%) foram diagnosticados com criptococose. Três pacientes foram excluídos do presente estudo, pois embora apresentassem a presença de leveduras encapsuladas ao exame microscópico direto contrastado com tinta nanquim, característico de *Cryptococcus* sp., não apresentaram crescimento em cultura, exame considerado o “Padrão Ouro”. (**Figura 10**).

Figura 10. Diagrama de fluxo de etapas no diagnóstico e registro médico no Hospital das Clínicas e Hospital Correia Picanço.



Fonte: OLIVEIRA, E.P (2021).

5.1 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Das 26 amostras biológicas provenientes dos 24 pacientes, 20 (76,92%) foram do líquido cefalorraquidiano, quatro (15,38%) de hemoculturas e dois (7,96%) de urina. Pode-se observar que em dois pacientes foram coletados dois tipos de amostras biológicas

para análises. A partir do material biológico obtido foi realizado, exame direto, e/ou cultura, e/ou teste imunológico (crypto latex) como pode ser observado na **Tabela 4**.

Tabela 4 . Diagnóstico laboratorial para criptococose.

Amostras	LCR		Sangue (hemocultura)		Urina		Total	Positividade
	nº	%	nº	%	nº	%		
	20		4	15,38	2		26	100
	76,92				7,36			
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)		
Testes								
ED	20	0	0	0	0	0	20	100%
Cultura	20	0	4	0	0	0	24	100%
Crypto latex	0	0	0	0	1	1	2	50%

ED- exame direto; nº- número; %- porcentagem.

Fonte: OLIVEIRA, E.P (2021).

O LCR foi o material biológico com maior predomínio na análise laboratorial (76,92%), refletindo o tropismo que o fungo tem pelo SNC sendo associado ao HIV ou não, seguido da hemocultura (15,38%). O diagnóstico para criptococose é realizado rotineiramente pela evidência da estrutura fúngica encapsuladas no exame direto por meio de um contrastante, tinta nanquin, e pelo isolamento do fungo através da cultura (WILLIAMSON et al., 2016).

De acordo com Maziarz; Perfect (2016) a sensibilidade do ED depende da carga fúngica, em pacientes não-HIV é possível evidenciar positividade entre 30 e 50%, e 80% para pacientes HIV. Para Williamson et al. (2016), o ED apresenta sensibilidade entre 70-90% em pacientes não infectados pelo HIV e, 95-100% em pacientes infectados pelo HIV e que também apresentem infecção no SNC. Ao analisar a sensibilidade da cultura, Maziarz; Perfect (2016) afirmam que, o LCR e a hemocultura apresentam 90% e 70% de positividade, respectivamente, em pacientes HIV. De acordo com Kon e colaboradores no Consenso sobre criptococose (SATIE-KON et al., 2008), a cultura é positiva em 89% dos pacientes não-HIV e 100% nos pacientes HIV. No nosso estudo, foi verificado 100% sensibilidade para o exame direto e cultura. Este dado pode ser justificado pela alta carga fúngica em decorrência a debilitação imunológica do paciente.

Para a análise utilizando o teste de aglutinação em látex (crypto látex), foi possível verificar de acordo com a **Tabela 4**, que a sorologia foi realizada em dois pacientes, destes, um (50%) apresentou positividade no teste sorológico feito na urina, bem como

positividade através do LCR com a visualização das leveduras encapsuladas características de *Cryptococcus* sp., Para a análise do segundo paciente também executado através da urina foi apresentado resultado negativo, um (50%), e quando realizado uma contraprova no mesmo paciente por meio do LCR, foi evidenciado a presença de leveduras encapsuladas características de *Cryptococcus* sp. Destaco que, em ambas as amostras de LCR, foram obtidos os isolados destes dois pacientes.

O teste de aglutinação de partículas de latex poder ser uma alternativa para fins diagnósticos e monitorização, podendo ser realizado por meio da urina, LCR e lavado brocoalveolar, este, apresenta sensibilidade maior que 90% em pacientes com meningite criptocócica (KON et al., 2008).

De acordo com Andrade e colaboradores (2017) afirma que os testes de aglutinação em latex, podem apresentar algumas limitações, tais como custo elevado, resultados falsos positivos no soro de pacientes com reumatismo e de forma rara pode apresentar reação cruzada com *Trichosporom*, também pode apresentar reações falsos negativos, de forma rara, quando há baixos títulos antigênicos ou até mesmo com altos títulos antigênicos (efeito prozona), presença de imunocomplexos, ou quando ocorre a infecção por *Cryptococcus* com pouco ou nenhuma cápsula, dificultando sua positividade, sendo um ponto chave do teste a pesquisa do antígeno capsular.

O nosso estudo apresenta um dado aquém da sensibilidade relatada anteriormente, uma vez que o teste Crypto latex apresentou um (50%) resultado falso negativo, mesmo quando em contraprova se obteve a positividade da infecção criptocócica no paciente. Este dado contraria a sensibilidade reportada na literatura. No entanto, mais testes deveriam ter sido realizados para fidelizar tal achado, pois não havia informações da realização do teste para os demais pacientes, nem o motivo da realização do teste apenas em dois pacientes.

5.2 PERFIL CLÍNICO-DEMOGRÁFICO

As análises clínicas-epidemiológicas da criptococose foram coletadas as principais informações por meio da análise de prontuários dos 24 pacientes diagnosticados com “neurocriptococose”, “meningite criptocócica” ou “meningite fúngica” que obtiveram ED e cultura positiva.

Com relação ao gênero mais acometido, quatorze (58%) pacientes eram do sexo masculino e, dez (42%) do sexo feminino. Dados estes que se encontram totalmente de acordo com as demais literaturas encontradas (MAYER et al., 2003; MORA et al., 2011;

MEZZARI et al., 2013; AGUIAR et al., 2017; BRASIL, 2019). Um outro estudo feito por Mora e colaboradores (2011), ao avaliar o número de casos de criptococose por um período de 13 anos (janeiro de 1998-maio de 2010), foi possível verificar a prevalência maior na população masculino (69,46%). Para esta informação, ainda se desconhece o motivo da predominância pelo gênero masculino, todavia, acredita-se que o homem seja mais susceptível as infecções causadas por *C. neoformans* e *C. gattii* devido a influências hormonais, pois, é possível que os hormônios produzidos pelo sexo feminino desempenhem um papel crucial na defesa contra estes propágulos fúngicos (MEZARRI et al., 2013)

Quanto a faixa etária atingida, pode-se constatar um maior percentual de pacientes entre 30-49 anos como mostra a **Tabela 5**.

Tabela 5. Distribuição dos casos de criptococose de acordo com faixa etária e sexo dos pacientes atendidos em duas unidades de saúde do Pernambuco.

Faixa etária	Gênero			
	Masculino		Feminino	
	n°	%	n°	%
18-29	3	21,4	1	10
30-39	7	50,0	2	20
40-49	3	21,4	5	50
50-59	1	7,2	1	10
60-69	0	0	1	10
Total	14	58	10	42

n°-número; %- porcentagem

Fonte: OLIVEIRA, E.P (2021).

Quando avalia-se o sexo masculino, evidencia-se uma prevalência entre 30-39 anos, e para o sexo feminino entre 40-49 anos. Estudos realizados no Brasil, demonstram que a prevalência de faixa etária pode sofrer pequenas variações, e esta informação pode ser observada em estudo epidemiológico no hospital das clínicas de Uberlândia realizado por Aguiar e colaboradores (2017), tendo sua prevalência entre 20-40 anos. Já um estudo epidemiológico de criptococose em um hospital público do Rio Grande do Sul realizado por Mezzari e colaboradores (2013), a faixa etária mais acometida esteve entre 30-39 anos, corroborando nossos achados. É importante lembrar que, os pacientes da faixa etária entre 30-39 anos, nasceram e foram criados na época que surgiu e expandiu o HIV, e coincidentemente, a partir da década de 80 ocorreram mudanças comportamentais, no

que tange os comportamentos sexuais e de relacionamentos com múltiplos parceiros causando a disseminação do HIV e, conseqüentemente a expansão de infecções oportunistas como a criptococose.

Com relação a etnia, seis (25%) pacientes se autodeclaravam como negros, quatro (16,7) como pardos, e em 14 (58,3%) prontuários não haviam especificações étnicas. Alguns estudos relatam que ocorre uma maior prevalência dessas micose em pacientes autodeclarados brancos, como descrito no estudo epidemiológico de ciptococose em um hospital escola em Santa Maria no Rio Grande do Sul, realizado por Ianiski e colaboradores (2018), bem como no estudo de Mezzari e colaboradores (2013)- No entanto, neste presente estudo, a ocorrência observada foi na população de origem afro-americano, seguido de pardos. Essa divergência pode ser reflexo da falta de especificações nos prontuários analisados neste estudo, onde 58% (n=14) do casos não apresentavam esta informação, ou, pode ser esclarecido devido as divergências que dá-se quanto as definições de etnias. Mesmo assim, é possível afirmar que não existe uma correlação significativa entre a etnia e a criptococose que a classifique como determinante.

Dos 24 prontuários analisados, 11 (45,83%) não apresentavam ocupação informada, três (12, 5%) tinha como trabalho afazeres domésticos, dois (8,33%) eram agricultores, dois (8,33%) autônomo, um (4,16%) auxiliar acadêmico, um (4,16%) auxiliar de serviços gerais, um (4,16%) lanterneiro, um (4,16%) mecânico, um (4,16%) pedreiro, e um (4,16%) jornalista. A atividade profissional observadas neste estudo foram diversas, o que impossibilitou uma correlação da atividade laboral com a criptococose. Entretanto, foi possível observar que dentre as ocupações mencionadas, apenas, um (4,16%) exercia função de nível superior, dessa forma hipotetizamos que exista alguma correlação com nível de escolaridade. Contudo, mais estudos devem ser melhores explorados para corroborar esta informação.

Em relação a distribuição espacial de casos de criptococose no estado do Pernambuco durante 28 meses de estudo, pode-se observar de acordo com a **Figura 11** que a maior ocorrência foi nos pacientes que residiam na cidade do Recife (n=8; 33,33%), seguido de Igarassu (n=2; 8,33%), Palmares (n=2; 8,33%), Paulista (n=2; 8,33%), Brejo da Madri de Deus (n=1; 4,16%), Ferreiros/Catumanga (n=1; 4,16%), Jaboatão (n=1; 4,16%), Ribeirão (n=1; 4,16%), Serra Talhada (n=1; 4,16%), Tabira (n=1; 4,16%), Tracunhaém (n=1; 4,16%), Vitória de Santo Antão (n=1; 4,16%) e, não informado (n=2; 8,33%). Tal achado, reportando o município de Recife como tendo a maior números de casos de criptococose, pode ser explicado, por esta se tratar do maior polo em saúde do

Estado de Pernambuco, além dos pacientes da capital possuem maior facilidade de acesso aos hospitais desta região. Hipotetizamos ainda que a elevada concentração de pombos em grandes centros urbanos pode também estar correlacionada, visto que os indivíduos que residem nestas localidades são mais expostos aos propágulos fúngicos, e conseqüentemente, desenvolvem em maior proporção a doença. Ainda assim, são aspectos que precisam ser melhor elucidados.

Figura 11. Distribuição do número de casos de criptococose no estado do Pernambuco (agosto de 2017 a dezembro de 2019).



Fonte: <http://www.mppe.mp.br> (modificado).

Ao analisar a distribuição temporal dos casos, foi possível perceber que a maior número de internação por criptococose ocorreu no ano de 2018 com 13 (54,16%) casos, seguido de 2017, seis (25%) e 2019 com três (12,5%). Em relação aos meses, abril de 2018 (30,76%), seguido de janeiro, agosto e outubro, ambos com (13,63%) entre 2017 a 2019 foram os meses com o maior número de casos como mostra a tabela abaixo (**Tabela 6**).

Dos 24 prontuários avaliados, dois (8,33%) não possuíam a informação descrita no registro. Infelizmente devido ao tamanho da amostragem, não foi possível inferir aspectos de sazonalidade e conseqüentemente não foi verificada a ocorrência de surto.

Tabela 6. Número de casos em meses e ano de internação por neurocriptococose.

MÊS	2017		2018		2019		TOTAL	
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
JAN	-	-	2	15,39	1	33,33	3	13,63
FEV	-	-	1	7,69	1	33,33	2	9,09
MAR	-	-	2	15,39	-	-	2	9,09
ABR	-	-	4	30,76	-	-	4	18,18
MAI	-	-	2	15,39	-	-	2	9,09
JUN	-	-	-	-	-	-	-	-
JUL	-	-	1	7,69	-	-	1	4,54
AGO	2	33,33	1	7,69	-	-	3	13,63
SET	1	16,66	-	-	-	-	1	4,54
OUT	2	33,33	-	-	1	33,33	3	13,63
NOV	1	16,66	-	-	-	-	1	4,54
DEZ	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	6		13		3		22	

nº-número; %- porcentagem

Fonte: OLIVEIRA, E.P (2021).

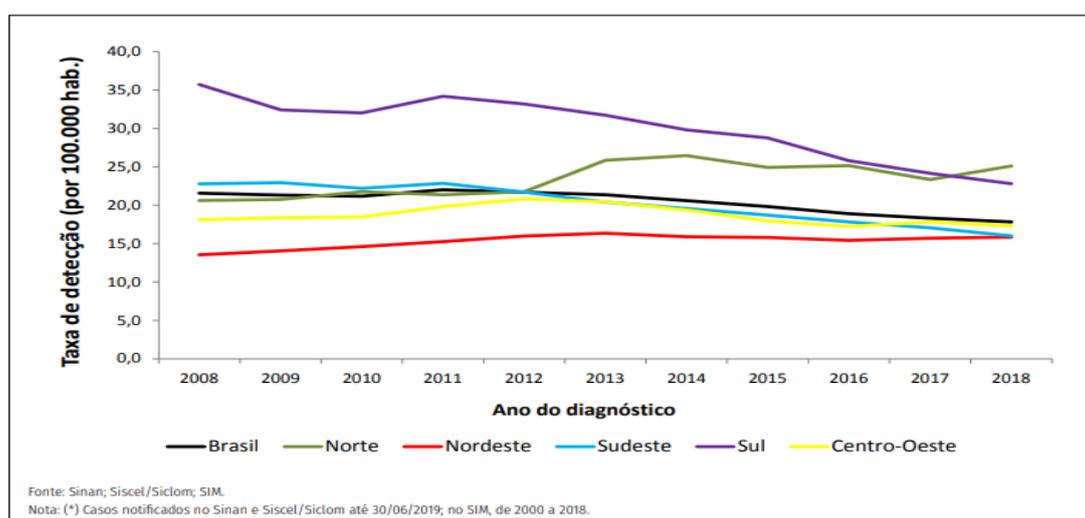
Ao avaliar o *status* imunológico dos pacientes com criptococose, foi possível verificar que a infecção foi mais prevalente em pacientes HIV/AIDS totalizando 20 (83,33%) casos. Este dado coincide com vários outros estudos na literatura, tais como Mezzari et al. (2013) e Nunes et al. (2018), pois a criptococose tem condição oportunista de importância médica, sobretudo em pacientes com AIDS. No Brasil, a meningite criptocócica está entre a quarta manifestação mais prevalente em pacientes com AIDS/SIDA, e a segunda que mais atinge o SNC (JARVIS e HARRISON, 2007).

No Brasil, segundo os boletins epidemiológicos a cerca da AIDS (BRASIL, 2017, 2018 e 2019), entre 1980 e 2017 foram notificados 576.245 mil casos, em 2018, o número aumentou para 606.936 casos e, em 2019 esse número disparou para 966.058 casos. Foi

observado também de acordo com o boletim epidemiológico em 2019 que a maior prevalência se apresentou no sexo masculino (65,5%), e (34,5%) para sexo feminino.

De acordo também com o boletim epidemiológico de AIDS (BRASIL, 2019), no território brasileiro, o maior número de casos de HIV se configura nas Regiões Sul e Sudeste (51,3% e 19,9% respectivamente), e conseqüentemente, estes apresentam também a maior correlação entre HIV-criptococose. Para a Região Nordeste houve uma tendência de crescimento nos últimos dez anos, observando também um aumento mesmo que baixo no estado do PE em (1,1%). No entanto, mesmo o Nordeste estando em fase crescente de casos, ele ainda fica atrás da Região Norte como pode ser observado na **Figura 12**.

Figura 12. Taxa de detecção de AIDS de acordo com as regiões, por ano no Brasil.



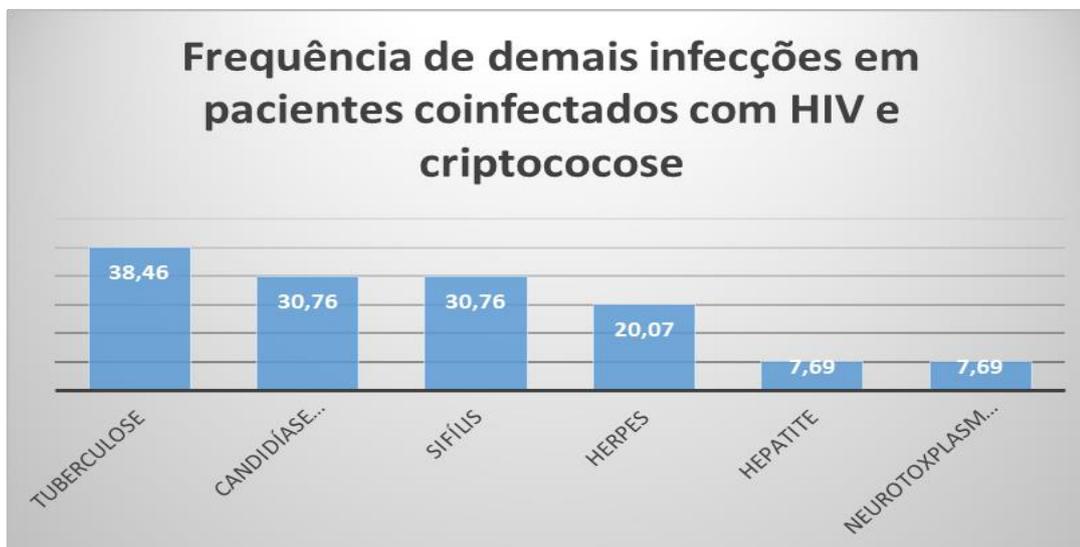
Fonte: BRASIL (2019).

Dentre os pacientes que tinham HIV, 13/20 pacientes (65%) tiveram coinfeção, tendo a tuberculose como a mais frequente cinco (38,46%), seguido da candidíase oral/esofágica, quatro (30,76%), como podendo ser evidenciado na figura abaixo (**Figura 13**). É importante ressaltar que, destes 13 pacientes, cinco (30,46%) apresentaram mais de um tipo de coinfeção de acordo com as informações contidas nos prontuários.

A correlação entre as coinfeções criptococose-HIV-tuberculose, corrobora alguns estudos como o de Mazzeri e colaboradores (2013), bem como o descrito por Fang e colaboradores (2017). Outra comorbidade, como transplante renal, foi observada em uma paciente, bem como também a sífilis de acordo com a **Figura 13**. O transplante de órgão é considerado a terceira causa mais comum de correlação com a criptococose devido a

baixa da imunidade que estes pacientes apresentam pelo uso de corticoterapias (PYRGOS et al., 2013).

Figura 13. Frequência de demais infecções em pacientes coinfetados com HIV e criptococose.



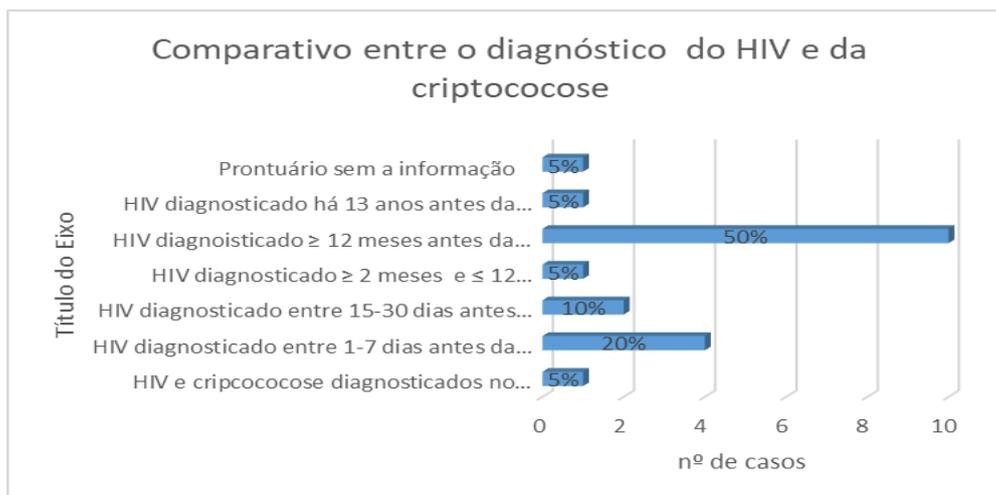
Fonte: OLIVEIRA, E.P (2021).

Ao avaliarmos os três (n=3/24; 12,5%) pacientes não infectados por HIV, um apresentou coinfeção entre criptococose e hepatite B e dois apresentaram coinfeção entre criptococose e tuberculose. Sendo assim, é possível inferir que neste estudo ambos os grupos (HIV+ e HIV-) tiveram a tuberculose como a coinfeção mais prevalente.

Vale ressaltar que, dentre os pacientes avaliados (24), 20 (83,33%) conviviam com o HIV, três (12,5%) eram não-HIV e um (4,16%) não havia determinada informação no prontuário.

Ao compararmos a data de diagnóstico do HIV e o desenvolvimento da criptococose, foi possível considerar que dentre os 20 pacientes diagnosticados com HIV e criptococose, um (5%) obteve o diagnóstico do HIV e criptococose no mesmo dia, quatro (20%) obtiveram o diagnóstico da criptococose entre 1-7 dias após o diagnóstico do HIV, dois (10%) entre 15-30 dias, um (5%) apresentou a infecção entre o 2º e 12º mês de diagnóstico do HIV, dez (50%) receberam o diagnóstico da infecção por criptococose após ou igual período de 12 meses do diagnóstico do HIV, um (5%), já convivia há 13 anos com o HIV antes de desenvolver a criptococose e, em um (5%) prontuário não constava essa informação, como representado na **Figura 14**.

Figura 14. Comparativo entre o diagnóstico do HIV e o tempo de desenvolvimento da criptococose.



Fonte: OLIVEIRA, E.P (2021).

Ao avaliarmos o uso da Terapia Antirretroviral (TARV) pelos pacientes diagnosticados com HIV, apenas quatro (20%) faziam uso regular da medicação, quatro (20%) tiveram o tratamento abandonado, um (5%) faziam uso irregular, seis (30%) não faziam uso por não saber do HIV e, em cinco (25%) não havia a informação reportada no registro.

Antes da era “TARV” ficar disponível, o HIV era a infecção que mais causava óbito em pacientes HIV com TCD₄ <100 células/ μ l, após a disponibilidade de tal medicação a mortalidade caiu significativamente, e embora a taxa de mortalidade tenha diminuído com o uso regular da TARV, em países com epidemia do HIV esta taxa ainda se encontra elevada.

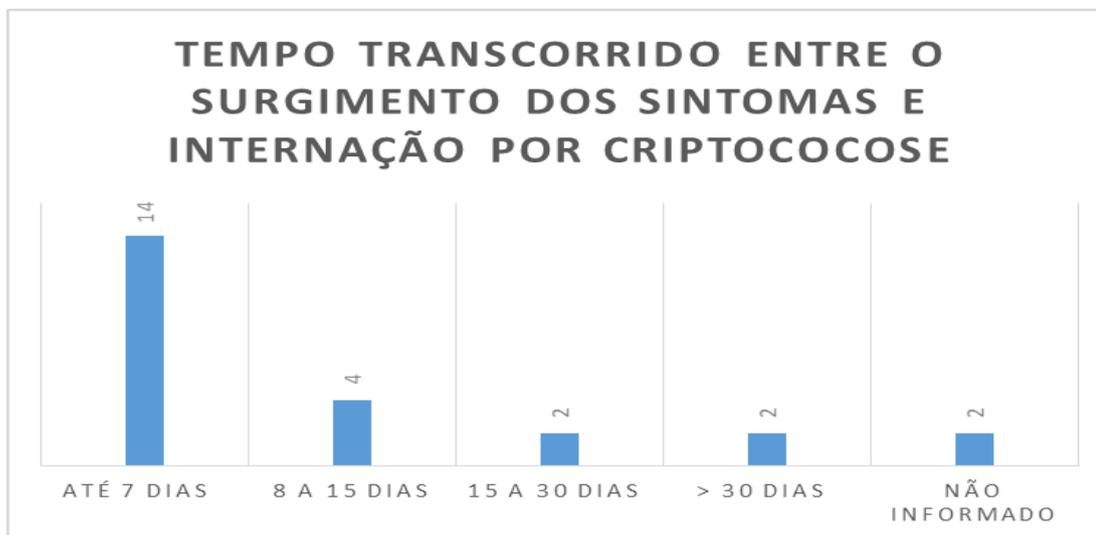
Um estudo feito em um estado do Pantanal brasileiro realizado por Nunes e colaboradores (2018), ao efetuar uma análise sobre o uso da TARV, verificou-se que 41,6% (n=35) da sua população estudada faziam o uso a medicação, no entanto, apenas (20,2%) deles faziam o uso de forma regular. Comparativamente, estes dados reiteram nossos resultados.

De acordo com a literatura, é sabido que o uso regular do TARV por pacientes com HIV, irá diminuir de forma significativa a infecção criptocócica, contudo, em pacientes não-HIV esta mudança não é percebida, uma vez que estes pacientes não fazem o uso de tal medicação e, nem precisam (SEVERO et al., 2009).

No que diz respeito ao tempo transcorrido entre a presença de sinais e sintomas anterior a admissão hospitalar relacionado à criptococose, foi verificado que 14 pacientes (58,33%) manifestaram sintomatologia precedentemente à internação por sete dias ou menos, conforme mostra a **Figura 15**. O resultado obtido nesta pesquisa corrobora um

estudo realizado por Darzé e colaboradores (2000) em Salvador, Bahia, ao avaliarem 104 casos de criptococose; além de um outro estudo realizado por Vieira-Junior, 2015, em um centro de referência do Piauí onde em sua pesquisa 25% dos pacientes tiveram internações hospitalares com ≤ 7 dias de sintomatologia.

Figura 15. Tempo entre os sintomas e internação hospitalar por criptococose.



Fonte: OLIVEIRA, E. P (2021).

Ao avaliarmos o tipo de admissão hospitalar, em 22/24 (91,66%) prontuários constavam esta informação, e os 22 (100%) dos pacientes tiveram entrada hospitalar através do serviço de emergência, destes, oito (36,36%) foram transferidos para Unidade de Terapia Intensiva (UTI).

No momento do atendimento médico, os sinais e sintomas clínicos mais elencados foram: febre, 18 (75%), cefaleia intensa, 15 (62,50%), rigidez na nuca, oito (33,33%), diarreia com ou sem sangue, oito (33,33%), vômito, sete (29,26%), perda de peso, sete (29,26%), convulsão, seis (25%), tosse seca ou produtiva, quatro (16,66%), dificuldade auditiva, quatro (16,66%), dificuldade visual, três (12,5%), náuseas, três (12,5%), desmaio, três (12,5%), perda do movimento dos membros inferiores, três (12,5%), desconforto estomacal, três (12,5%), dispnéia, três (12,5%), alucinações, dois (8,33%), sonolência, dois (8,33%), diurese, dois (8,33%), tontura, um (4,16%) e tremores, um (4,16%).

Em relação ao nível de consciência, 17 (70,83%) pacientes se encontravam conscientes e orientados, 5 (20,83%) tiveram perda do nível de consciência e, em 2 (8,33%) não havia nenhum registro desta informação, como pode ser observado na

Tabela 7.

Tabela 7. Frequência dos sinais e sintomas clínicos apresentados pelos pacientes com criptococose.

Sinais e sintomas			Nível de consciência		
	n ^o	%		n ^o	%
Febre	18	75	Consciente	17	70,83
Cefaleia	15	62,5	Perda da consciência	5	20,83
Rigidez na nuca	8	33,33			
Diarreia c/ ou s/ sangue	8	33,33	Não informado	2	8,33
Vômito	7	29,26			
Perda de peso	7	29,26			
Convulsão	6	25			
Tosse seca ou produtiva	4	16,66			
Dificuldade auditiva	4	16,66			
Dificuldade visual	3	12,5			
Náuseas	3	12,5			
Desmaio	3	12,5			
Perda do movimento do MMII*	3	12,5			
Desconforto estomacal	3	12,5			
Dispneia	3	12,5			
Alucinações	2	8,33			
Sonolência	2	8,33			
Diurese	2	8,33			
Tontura	1	4,16			
Tremores	1	4,16			

MMII: membros inferiores*; n^o-número; %- porcentagem

Fonte: OLIVEIRA, E.P (2021).

De acordo com a literatura (SILVEIRA et al., 2018; RÊGO et al., 2019), a criptococose em paciente portadores do HIV, têm geralmente quadros clínicos inespecíficos, dificultando o diagnóstico da doença, contudo, alguns sinais e sintomas são frequentemente retratados como tosse, dispnéia, emagrecimento, dor torácica quando ocorre uma criptococose de acometimento pulmonar; logo, quando atinge o sistema nervoso central os mais observados são: febre, mal estar, cefaleia, vômito, alterações comportamentais, convulsões, alterações visuais ou auditivas, entre outros sinais sintomas. Desta forma, tais achados coincidem com o descrito na literatura, entretanto, no nosso estudo, a febre foi a manifestação mais mencionada, seguida da cefaleia intensa, divergindo de alguns estudos, tais como, Mora e colaboradores (2011), Hamadani e colaboradores (2018) e Firacative e colaboradores (2018), que reportaram a cefaleia como o sintoma mais prevalente em suas análises.

A meningoencefalite criptocócica foi a forma clínica mais predominante 17 (70,83%) em nosso estudo, corroborando outros estudos ao afirmar que o SNC é o sítio mais

acometido pela infecção criptocócica, seguido da criptococose pulmonar em quatro (16,66%) também conhecida como CID10-B45.0, em um registro (4,16%) foi relatado a neurocriptococose associada a forma pulmonar e, em dois (8,33%) não havia nenhuma informação reportada sobre a forma clínica.

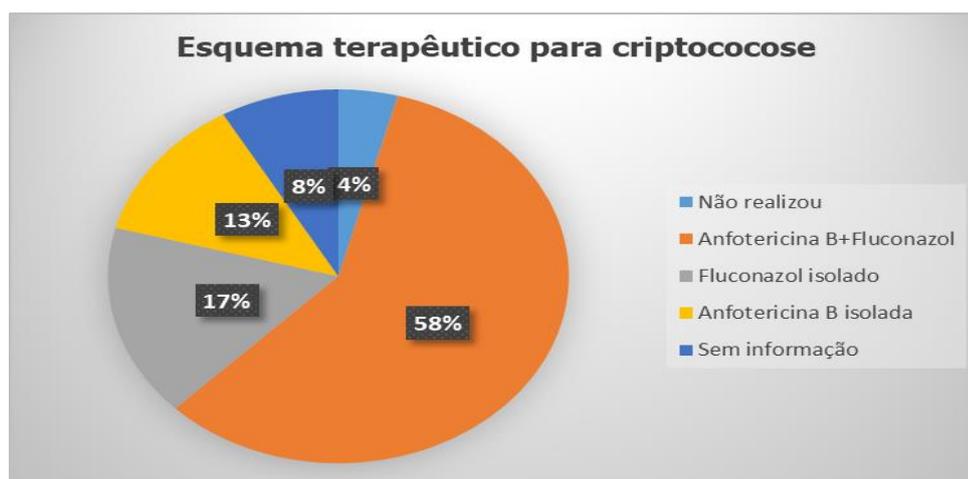
A manifestação clínica da criptococose vai depender do estado imunológico em que o indivíduo se encontra (MEZZARI et al., 2013). Segundo o Consenso em criptococose (SATIE-KON et al., 2008) a forma clínica que predomina é a neurocriptococose (80%), onde esta infecção pode estar isolada ou associada ao acometimento do pulmão, mesmo que em menor proporção, como foi observado nesta pesquisa ao reportarmos um caso de associação. A segunda forma clínica predominante é a pulmonar, validando os dados obtidos em nosso estudo. Estudos realizados por Aguiar e colaboradores (2017) e Mezzari e colaboradores (2013), corroboram os nossos achados, pois, em suas pesquisas eles observaram uma prevalência de neurocriptococose em 75% e 74% respectivamente. Um trabalho realizado por Faracative e colaboradores (2018), ao analisar casos de criptococose na América Latina, verificaram que, a meningite criptocócica é ainda a apresentação clínica mais frequente, e a forma pulmonar é a que mais apresenta retardo diagnóstico devido a sua semelhança em sinais e sintomas com a tuberculose, acarretando assim para uma elevada taxa de morbidade e mortalidade, de acordo com Silva e Gagliane (2014).

Dos prontuários que foram avaliados nesta pesquisa, apenas sete (29,16%) possuíam a informação de contagem dos linfócitos TCD₄. Destes, dois (28,57%) tinham contagem entre 223-308 células/mm³ e cinco (71,43%) apresentaram valor entre 23-131 células/mm³. A falta de informação também foi descrita em um trabalho realizado por Aguiar e colaboradores (2017), onde ao avaliar 41 prontuários, apenas 17 (41,46%) continham a contagem de TCD₄. De acordo com a literatura, pacientes com TCD₄ baixo (<100 células/mm³) tem maior probabilidade de desenvolver infecção por *Cryptococcus* e, que a neurocriptococose apresenta uma estreita relação com os pacientes portadores do HIV (IANISKI et al., 2018). De acordo com a OMS, nestes casos é recomendado que ocorra um monitoramento frequente e eficaz quanto a esta infecção (OMS, 2011). Em relação a disponibilidade de informação quanto a carga viral (CV) para o HIV, foi verificado que apenas seis (30%) apresentavam em seu registro o valor da CV, variando entre 1.588 a 256.585 cópias.

Ao avaliarmos a conduta terapêutica, foi possível verificar que 21 pacientes (87,50%) receberam a terapia antifúngica, um foi a óbito após 24h de internação, portanto não foi realizado esquema terapêutico e dois não possuíam esta informação em prontuário.

Para a fase de indução 14/24 (58%) utilizaram o esquema combinado de Anfotericina B associado ao Fluconazol, três (13%) utilizaram a Anfotericina B (Anf B) como único fármaco nesta fase e quatro (17%) utilizaram o fluconazol (FLC) de forma isolada (**Figura 16**). Segundo as diretrizes da Sociedade de Doenças Infecciosas da América (SDIA) é recomendado em casos mais graves a utilização da Anf B combinado com a 5-fluocitosina (5FC) na fase de indução, seguido da utilização do fluconazol na fase de consolidação, no entanto, no Brasil a 5FC ainda é um fármaco indisponível ou até mesmo inacessível, desta forma, utiliza-se a combinação da Anf B + FLC para a fase de indução em casos mais graves. Dessa maneira, a combinação terapêutica escolhida e sua proporção em percentual está de acordo com as demais literaturas encontradas (SATIE-KON et al., 2008; PIZANI; SANTOS, 2017; FIRACATIVE et al., 2018; RÊGO et al., 2019).

Figura 16. Esquema terapêutico utilizada nos casos de criptococose.



Fonte: OLIVEIRA, E.P (2021).

Dos 17 pacientes que utilizaram a Anf B como estratégia terapêutica 13 (76,47%), utilizaram a formulação Anfotericina B Desoxicolato (ABD), e quatro (23,53%) a Anfotericina B Lipossomal (ABL), ambas possuem a mesma atividade, no entanto, devem ser administradas em doses diferentes, 0,5 a 0,7 mg/kg/dia e 1,0 mg/kg/dia respectivamente. Apesar da formulação ABL ser menos nefrotóxica, seu uso é desencorajado devido ao seu alto custo, apenas sendo indicada em casos de intolerância a ABD, ou de refratariedade (BERMAS e GEDDES-MS-ALIESTER, 2020).

Algumas complicações foram observadas ao longo das internações, n=9/21 (42,85%) dos pacientes apresentaram algum tipo de infecção secundária e receberam antibióticos diversos para o tratamento, quatro (19,04%) apresentaram insuficiência renal,

quatro (19,04%) apresentaram deficiência respiratória e tiveram que ser entubados, três (14,28%) tiveram que receber bolsa de sangue resultante de uma grave anemia desenvolvida e um paciente (4,76%) desenvolveu trombose venosa profunda (TPV).

A respeito da evolução clínica dos pacientes, foi possível verificar que, 11 (46%) pacientes receberam alta hospitalar com melhora clínica, destes, apenas quatro (36,36%) permaneceram na fase de manutenção da criptococose recebendo o fluconazol, dos que abandonaram a fase de manutenção, um (14,28%) apresentou recidiva e voltou a ser internado, 11 (46%) foram a óbito, e, em dois (8%) dos prontuários não estavam reportados estes dados.

A taxa de mortalidade apresentada neste estudo não foi a esperada quando se faz comparação com outros estudos recentes, como o de Ianiski e colaboradores (2018) declarando 83% de letalidade em sua pesquisa, bem como Firacative e colaboradores (2018) ao estudarem casos na América Latina e afirmaram que a letalidade nesta região é elevada comparada aos países desenvolvidas, e que o Brasil está na décima terceira colocação em óbito causado por *Cryptococcus*.

Os dados apresentados nesta pesquisa, podem refletir um diagnóstico laboratorial rápido para a criptococose aliado a uma escolha terapêutica eficaz, ocasionando a diminuição de óbitos e crescimento relacionado a alta hospitalar.

5.3 SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA *in vitro*

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada para 24 isolados clínicos de *Cryptococcus sp.* oriundos das 26 amostras biológicas obtidas na pesquisa

De acordo com a **Tabela 8** é possível observar que 20 isolados (83,33%) apresentaram sensibilidade a Anf B com valores de CIM $\leq 1 \mu\text{g.mL}$ e quatro (16,66%) demonstraram resistência apresentando CIM $\geq 2\mu\text{g/mL}$. Um trabalho conduzido por Silva e colaboradores (2008), ao realizarem teste de sensibilidade *in vitro* em 35 isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* isolados a partir de LCR, detectaram dois isolados resistentes a Anf B, corroborando este estudo. Segundo Silva et al. (2008); Li et al. (2012); Bermas e Geddes-Ms-Aliester (2020), apesar da ampla utilização deste medicamento em isolados clínicos de *Cryptococcus sp.* e este apresentar cerca de 99% de sensibilidade, é possível encontrar casos de resistência a Anf B especialmente em cepas de *C. neoformans*, contudo, é um dado pouco descrito na literatura. De acordo com Bermas e Geddes-Ms-Aliester (2020), este fator de resistência pode estar relacionado a mutações genéticas na biossíntese do ergosterol da membrana celular relacionadas ao

gene *ERG2*, sendo está inativação um dos únicos mecanismos descritos em relação a resistência a Anf B. Similarmente, esse mecanismo acontece para isolados clínicos de *Candida* sp. pois estes, já possuem resistência bem estabelecido na literatura, inclusive, sua recorrência a intolerância a anfotericina B é mencionado no CLSI M27-A3 (CLSI, 2008).

Tabela 8. Sensibilidade antifúngica contra isolados clínicos de *Cryptococcus*.

Isolados	Susbtâncias avaliadas		
	Valores de concentração testadas		
	µg.mL ⁻¹		
	Anf B ^{††}	FCZ [‡]	NTT ^{†††}
	0,03-16	0,125-64	0,125-64
17	0,25	2	64
20	0,125	4	64
24	0,125	16	1
26	0,125	2	1
29	0,125	2	64
34	0,125	2	32
35	0,125	2	32
39	0,125	8	1
40	0,25	16	1
41	0,03	16	1
42	0,06	8	1
43	0,25	8	4
44	2	8	8
45	0,25	2	8
46	0,5	64	8
47	2	16	8
60	0,25	32	4
61	0,25	16	8
62	2	16	32
63	8	8	32
64	0,25	16	1
76	0,25	8	4
77	0,25	4	4
78	0,5	8	1
ATCC ^{‡‡}	0,25	1	16

Anfo B-Anfotericina; FCZ-Fluconazol; NTT- nitrotiofeno-tiosemicarbazônico; ^{††}100% Inibição de Crescimento; [‡] ≥ 50% Inibição de Crescimento; ^{‡‡}ATCC – Coleção de Culturas Tipo Americana.

Fonte: OLIVEIRA, E.P (2021).

Para a determinação da CIM ao uso do fluconazol, observa-se que 15 (62,5%) dos isolados apresentaram sensibilidade apesar de alguns mostrarem CIMs mais elevados

que os descritos na literatura, oito (33,33%) dose-dependente e um (4,16%) apresentou resistência. Nossos dados corroboram os de um estudo realizado por Smith e colaboradores (2015), ao analisarem 198 isolados clínicos de *Cryptococcus* sp. e verificarem que 69% apresentaram sensibilidade ao FLC, também observando CIMs altos, 28% como dose-dependente e 3% resistente. Apesar do fluconazol ser considerado o medicamento mais eficaz na etapa de manutenção em pacientes com criptococose infectados ou não pelo HIV, alguns estudos vêm demonstrando crescimento nos relatos de resistências ao FLC (Chen et al., 2015). Segundo Bermas e Geddes-Ms-Aliester (2020), esta resistência pode ser evidenciada tanto para espécies de fungos de *Cryptococcus*, *Candida* e *Aspergillus* podendo estar associado a natureza fungistática apresentada por este fármaco, que ao ser administrada repetidas vezes, pode selecionar cepas e desenvolver resistência, o que acaba gerando inúmeros desafios à saúde, visto que existem poucos antifúngicos no mercado.

O composto nitrotiofeno-tiosemicarbazônico (NTT) foi preparado na mesma concentração que o FLC que é um fármaco amplamente utilizada em combinação ou de forma isolada nas fases de indução, consolidação e manutenção da criptococose, embora para este composto não exista *breakpoints* estabelecidos, foi adotado os pontos-de-corte do FLC.

Dos 24 isolados clínicos, 17 (71%) apresentaram excelentes resultados com CIMs menores quando comparado ao FLC, quatro (17%) apresentaram CIMs mais altos, categorizando a cepa como “dose-dependente” e três (12 %) apresentaram CIMs acima de 64 µg.mL. Um estudo realizado por Araújo-neto et al. (2017), utilizaram vários compostos de nitrotiofenos em um teste de sensibilidade *in vitro*, e verificaram uma excelente resposta antifúngica avaliando uma cepa de *C. neoformans*, principalmente pelo composto (NTT-08 e NTT-09), corroborando o presente estudo.

Outro trabalho recentemente publicado por Neves e colaboradores (2020), realizaram testes com os derivados tiofênicos em quatro cepas de *C. neoformans*, embora os CIMs abordados em sua pesquisa sejam mais elevados do que os encontrados neste referido trabalho, esta informação corrobora que estes derivados tiofênicos vêm se apresentando como compostos futuramente promissores, apesar que ainda estão sendo explorados e deverão ser mais estudados. Para análise do isolado controle *C. parapsilosis*, foi observado um CIM de 64 µg.mL, relativamente alto, corroborado pelo estudo Araújo-Neto et al. (2017) e Neves et al. (2020), que avaliaram também esta linhagem de referência e verificaram que algumas moléculas do nitrotiofeno-tiosemicarbazônico apresentam pouca ou nenhuma atividade antifúngica contra algumas

espécies de *Candida* sp., desta forma, em um estudo realizado por Araújo-neto et al. (2017), algumas mudanças estruturais nas moléculas testadas em sua pesquisas foram realizadas, e com isso as mesmas moléculas que antes não apresentaram efeitos, passaram a promover excelentes respostas antifúngicas.

A eficácia dos dois antifúngicos utilizados e da molécula de nitrotiofenotiosemicarbazônico foi verificada através da média geométrica das CIMs obtidas dos fármacos testados, e a diferença entre os valores das CIMs para cada fármaco foi determinada por teste não paramétrico de amostras relacionadas de Wilcoxon, onde o valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo (MAHMOUDI et al., 2016).

Foi possível observar que, de acordo com a **Tabela 9**, entre a anfotericina B e o fluconazol houve uma diferença significativa, sendo $p < 0,000027$, bem como de anfotericina para o nitrotiofenotiosemicarbazônicos representado por $p < 0,000018$, no entanto, ao avaliarmos o fluconazol com o nitrotiofenotiosemicarbazônicos, é possível constatar que não houve diferença estatística significativa quanto sua eficácia, porém, ainda assim este dado pode refletir como sendo esta molécula mais uma opção terapêutica, principalmente em casos de resistência e/ou não aceitação do tratamento com o fluconazol.

Tabela 9. Eficácia dos antifúngicos e molécula de tiofeno testada *in vitro*.

Espécie (n)		Substâncias avaliadas CIMs ($\mu\text{g/mL}$)		
		ANF B	FLC	NTT
	Variação	0,03-16	0,125-64	0,125-64
<i>Cryptococcus neoformans</i> (24)	Média Geométrica	0,27	7,5	6
ATCC	CIM	8	1	16

Fonte: OLIVEIRA, E.P (2021).

Anf B e FLC: $p < 0,000027$ (diferença estatisticamente significativa)

Anf B e NTT: $p < 0,000018$ (diferença estatisticamente significativa)

FLC e NTT: Sem diferença estatística significativa

5.4 IDENTIFICAÇÃO PROTEÔMICA POR MALDI-TOF MS

O método físico-químico por espectrometria de massas através de MALDI-TOF identificou 100% ($n=24$) dos isolados em âmbito de espécie como *Cryptococcus neoformans*, onde 15 (62,50%) destes foram distinguidos no âmbito de subespécies como *C. neoformans* var. *grubii* (**Tabela 10**). Em 15 (62,50%) isolados, o score foi $\geq 2,0$ indicando excelente resultado, 9 (37,50%) apresentaram score $>1,7$ e $< 2,0$ sinalizando

uma boa identificação, nenhuma identificação recebeu score <1,7 ou seja, todas as identificações se demonstram confiáveis. Este estudo se assemelha a outros trabalhos tais como McTaggart et al., 2011; Firacative et al., 2012; Zvezdanova et al., 2020, ao inferir que o MALDI-TOF/MS, conseguiu realizar identificações confiáveis para com seus isolados, sendo estes, validados e identificados previamente por meio das análises genotípicas, corroborando a técnica do MALDI TOF/MS.

Tabela 10. Identificações do Complexo *Cryptococcus* utilizando o MALDI-TOF/MS.

Resultados da classificação do Biotyper de Bruker Daltonik MALDI



Visão geral do resultado

Nome do analito	Organismo (melhor combinação)	Valor de pontuação	Organismo (segunda melhor partida)	Valor de pontuação
17 (++) (A)	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	2.168	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	2.168
20 (++) (A)	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	2.133	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	2.133
24 (++) (A)	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	2.111	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	2.111
26 (+) (B)	<i>C. neoformans</i>	1.711	<i>C. neoformans</i>	1.708
29 (+) (B)	<i>C. neoformans</i>	1.729	<i>C. neoformans</i>	1.711
34 (+) (B)	<i>C. neoformans</i>	1.720	<i>C. neoformans</i>	1.717
25 (++) (A)	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	2.167	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	2.167
39 (++) (A)	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	2.127	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	2.127
40 (++) (A)	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	2.096	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	2.096
41 (++) (A)	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	2.296	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	2.296
42 (++) (A)	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	2.082	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	2.082
43 (++) (A)	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	2.151	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	2.151
44 (++) (A)	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	2.287	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	2.287
45 (+) (B)	<i>C. neoformans</i>	1.778	<i>C. neoformans</i>	1.764
46 (+) (B)	<i>C. neoformans</i>	1.882	<i>C. neoformans</i>	1.878
47 (++) (A)	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	2.004	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	2.004
60 (++) (A)	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	2.227	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	2.227
61 (++) (A)	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	2.069	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	2.069
62 (++) (A)	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	2.124	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	2.124
63 (+) (B)	<i>C. neoformans</i>	1.745	<i>C. neoformans</i>	1.738
64 (+) (B)	<i>C. neoformans</i>	1.791	<i>C. neoformans</i>	1.787
76 (+) (B)	<i>C. neoformans</i>	1.732	<i>C. neoformans</i>	1.727
77 (+) (B)	<i>C. neoformans</i>	1.781	<i>C. neoformans</i>	1.775
78 (++) (A)	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	2.003	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	2.003

Verde= identificação de alta confiabilidade (score-2.00-3.00); amarelo= identificação de confiabilidade intermediária (score: 1.70-1.99).

Fonte: OLIVEIRA, E.P (2021).

McTaggart e colaboradores (2011) realizaram um estudo de custo de cada análise, comprovando o custo benefício da técnica. Ele afirma que, embora a aquisição da máquina apresente um custo alto, um investimento de 200.000,00 dólares, pois este

equipamento possui diversas aplicações laboratoriais de relevância clínica tanto bacteriana como fúngica, sua análise diferentemente de outros equipamentos de identificação, pode ser realizada diretamente do material biológico. Ele ainda complementa que o custo da preparação de cada amostra custa aproximadamente 0,50 dólares. Por este motivo, este equipamento torna a análise de baixo custo, rápida e que possui elevada qualidade e confiabilidade.

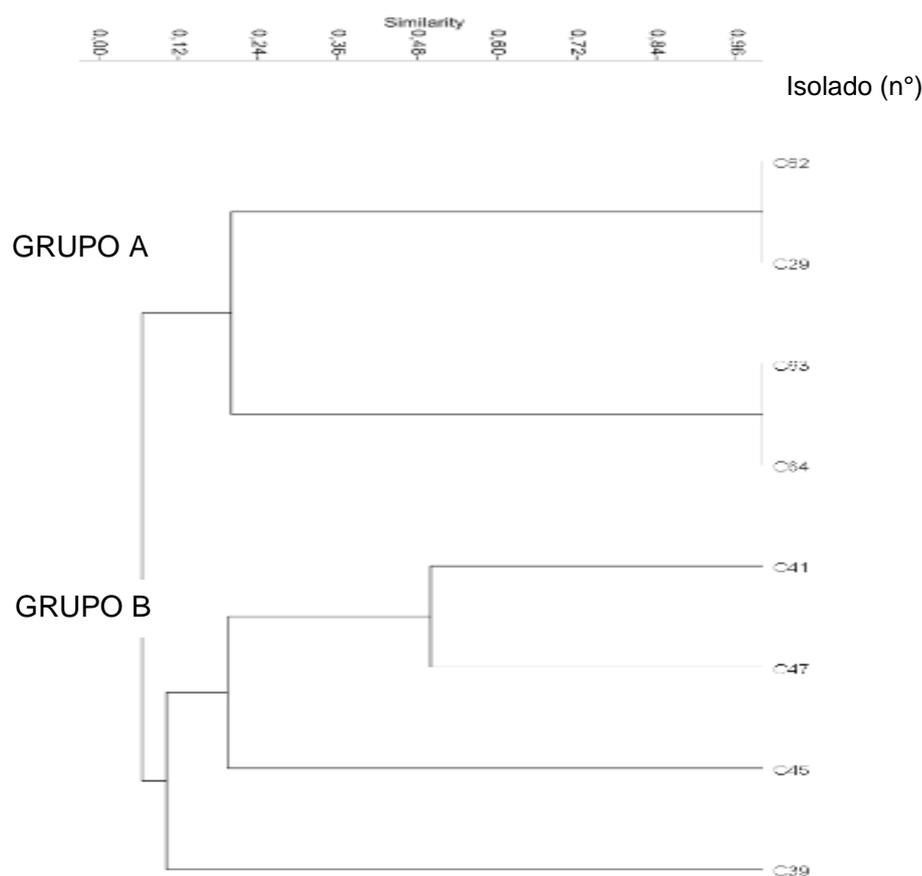
De acordo com alguns estudos, tais como Soares et al. (2019) e o Consenso de Criptococose (2008), o *C. gattii* é uma espécie endêmica no Brasil, especialmente, nas regiões Norte e Nordeste, e o *C. neoformans* se faz mais prevalente nas regiões Sul e Sudeste. No entanto, no nosso estudo, só houve o isolamento de espécies de *C. neoformans*, o que pode ser justificado por se tratar de uma espécie que acomete mais pacientes imunocomprometidos, embora, neste mesmo estudo foi reportado casos de pacientes não-HIV sendo acometido por *C. neoformans*. Isso implica dizer que, ainda há muito a ser estudado a cerca de eco-epidemiologia deste fungo, principalmente na região Nordeste.

5.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR ATRAVÉS DO ERIC-PCR

Para determinar a relação genética dos isolados através do ERIC-PCR (**Figura 17**), foi realizada uma escolha de forma aleatória de oito isolados, a princípio para verificar a reprodutibilidade da técnica, estes apresentaram bandas polimórficas indicando a presença de variabilidade genética entre os isolados de uma mesma espécie *C. neoformans*. De acordo com a presença ou ausência de bandas, os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa Past (método UPGMA-utilizando-se o coeficiente de Jaccard), e desta forma houve a construção de um dendograma.

O dendograma revelou a existência de dois grupos principais homogêneos (A e B) apresentando coeficiente de relação genética variando de 6,0% a 100%. O grupo A e B incluem amostras de mesma região e também de regiões distintas.

Figura 17. Dendograma de oito isolados de *Cryptococcus* sp. gerados a partir de bases genéticas através de fragmentos amplificados pelo ERIC-PCR.

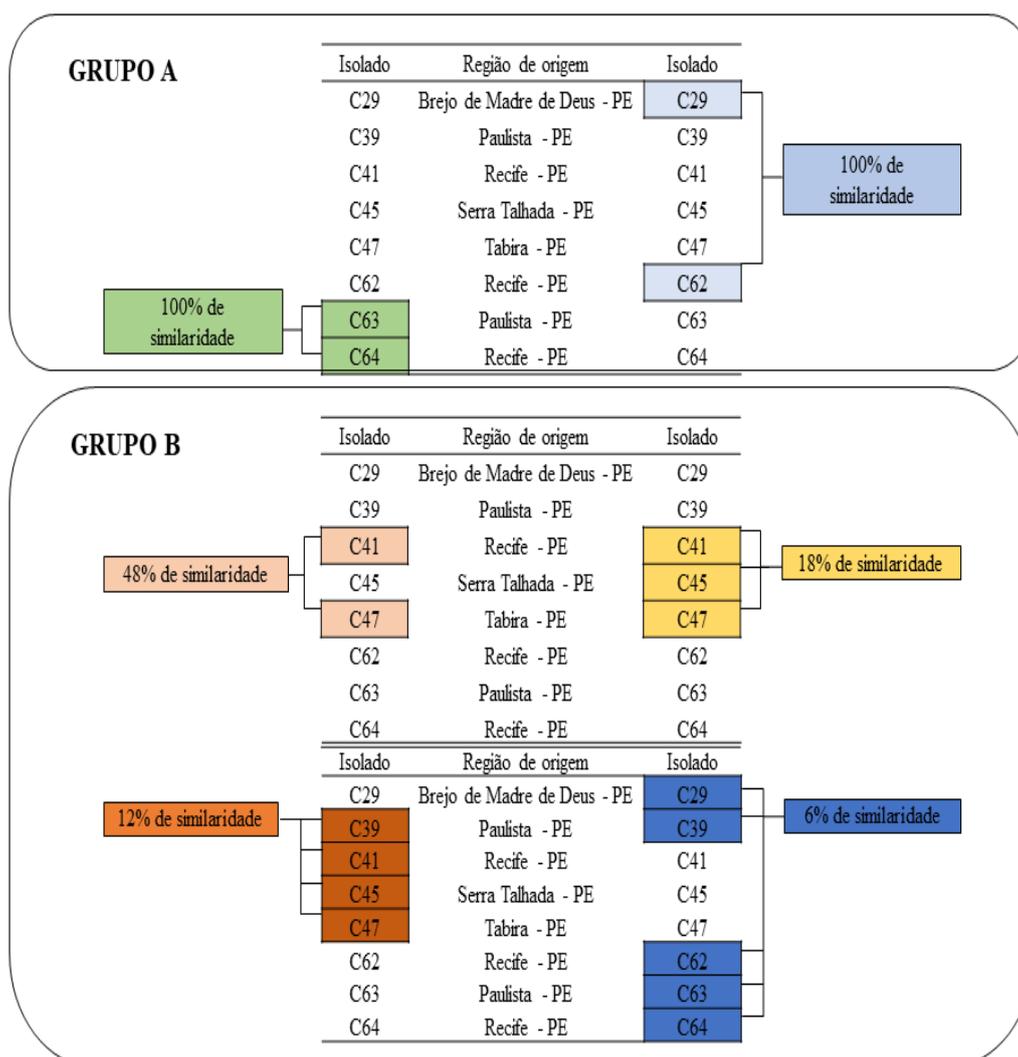


Fonte: OLIVEIRA, E. P (2021).

A **Figura 18** fornece uma ilustração das amostras analisadas com base nos genótipos. No grupo A, é possível verificar que, o isolado C62 e C29 são clones, pois apresentaram 100% de relação genética apesar de serem oriundos de pacientes que residiam em regiões geográficas diferentes (Recife e Brejo da Madre de Deus, respectivamente) e apesar de clones, apresentaram também CIMs diferentes para as drogas antifúngicas avaliadas bem como para o composto sintético NTT, este dado também é notado nos isolados C63 e C64, estes, oriundos de Paulista e Recife, respectivamente. É possível observar que, os isolados C62 e C64, pertencentes ao grupo A e, oriundos de pacientes residentes de uma mesma região geográfica (Recife) apresentam relação genética de apenas 18,0%, aproximadamente. No grupo B, os isolados C41 e C47 pertencentes a pacientes residentes de Recife e Tabira, respectivamente, apresentaram relação genética de 48,0%. O isolado C45 pertencente a um paciente de Serra Talhada apresentou 18,0% de similaridade com o C41 e C47. O isolado C39 oriundo de um paciente pertencente a região geográfica de Paulista é o mais distante geneticamente quando comparados aos demais apresentando 12,0% de

similaridade ao C41, C47 e C45, e estes, do grupo B se apresentaram geneticamente distantes quando comparados ao grupo A, cerca de apenas 6% de relação genética. É notado que, apesar dos isolados C41, C62 e C64 pertencerem a mesma região (Recife), o isolado C41, encontra-se geneticamente distante, apresentando, 6% aproximadamente de relação genética, o mesmo se observa nos isolados C39 e C63, com 6% aproximadamente de similaridade genética.

Figura 18. Relação genética das espécies de acordo as regiões de moradia dos pacientes.



Fonte: OLIVEIRA, E.P (2021).

Santos e colaboradores (2020), utilizaram o ERIC-PCR como uma ferramenta a mais para identificar e caracterizar geneticamente cinco isolados do gênero *Candida*, e verificaram que esta ferramenta demonstrou total eficácia, apesar de ser uma técnica que inicialmente foi criada para identificação e caracterização bacteriana. Um outro estudo realizado por Marisol (2019), ao analisar 19 cepas de *Cryptococcus neoformans*, também

verificou ampla versatilidade para a caracterização molecular, registrando 62% de relação genética até cepas geneticamente idênticas, clones (100%), corroborando nosso estudo nos dados obtidos e de reprodutibilidade. Sendo assim, é possível inferir que esta ferramenta pode sim, ser de suma importância, pois garante resultados rápidos e de baixo custo.

De acordo com Almeida e colaboradores (2015), Mey e colaboradores (2016) e Andrade e colaboradores (2010) as variabilidades genéticas estão intimamente relacionadas a variações de expressões fenotípicas, e conseqüentemente a múltiplos fatores de virulência ou perfil de susceptibilidade antifúngica. Estas caracterizações podem contribuir para diferentes perfis clínicos da doença, sendo assim, esta informação corrobora nosso estudo, no entanto, através deste estudo, ainda é possível predizer que, em nossos isolados (C29, C62 e C63, C64) mesmo sendo geneticamente idênticos, ou seja, clones, eles apresentaram CIMs diferentes frente aos antifúngicos testados, inclusive perfil de resistência, bem como CIMs diferentes frente ao composto NTT. Sendo assim, pode-se dizer que, a diversidade genética fúngica bem como espécies geneticamente idênticas podem apresentar resistência antifúngica, o que confirma a necessidade de técnicas cada vez mais rápidas, econômicas e de reprodutibilidade acessível.

É importante frisar que, dos 24 isolados obtidos, oito (33,33%) tiveram sua caracterização molecular pelo ERIC-PCR concluído, pois em decorrência ao COVID-19, ou seja, a pandemia, não foi possível a realização dessa análise para os demais isolados, no entanto, os demais encontram-se com seu DNA devidamente extraídos e estocados, para assim, em um momento subsequente concluirmos esta etapa analítica proposta no estudo.

6 CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos neste estudo, pode-se concluir que, a maioria dos pacientes diagnosticados com criptococose conviviam com o HIV e pertenciam ao gênero masculino;

A faixa etária de maior acometimento da criptococose se deu entre 30-49 anos, de etnia negra, sem ocupação estabelecida e residentes do município de Recife-PE;

O maior número de registro de criptococose se deu no ano de 2018 em pacientes HIV positivo, destes, a maioria não fazia uso do TARV de forma regular;

O principal sintoma apresentado foi a febre;

A meningoencefalite foi a principal forma clínica apresentada entre os dois grupos de pacientes (HIV positivo e negativo), destes, a maioria teve seu nível de consciência preservada;

A tuberculose foi o tipo de coinfeção mais relatado entre os dois grupos de pacientes reportados;

O esquema terapêutico mais utilizado foi a combinação de anfotericina B e fluconazol;

A relação de número de óbito e alta hospitalar mostrou igualdade percentual;

O antifúngico que apresentou melhores resultados *in vitro* foi a anfotericina B;

O *Cryptococcus neoformans* foi o principal agente etiológico dos casos de criptococose neste estudo, contrariando estudos epidemiológicos realizados no Nordeste;

Todos os oitos isolados avaliados através da técnica do ERIC-PCR apresentaram taxas de relações genética, destes, quatro se mostraram clones, embora oriundos de regiões diferentes e apresentando comportamentos antifúngicos distintos.

Diante do exposto, é sabido que os resultados obtidos neste trabalho demonstram a importância de estudos epidemiológicos, e é verdade que estes dados servirão de base de dados para futuros estudos neste estado, bem como fora dele.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, P. A. D. F. et al. The epidemiology of cryptococcosis and the characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated in a Brazilian University Hospital. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 2017. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1590/s1678-9946201759013>>. Acesso em: 8 ago. 2019.
- ALMEIDA, F.; WOLF, J. F.; CASADEVALL, A. Virulence-associated enzymes of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic*, v. 14, p. 1173-1185, 2015.
- ALMEIDA, R. L. G.; MACHADO, E. R. *Cryptococcus* spp. em pacientes com HIV/SIDA: Revisão da Literatura. *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e Saúde*, v. 18, p. 55-63, 2014.
- ALSPAUGH, J. A. Virulence Mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Fungal Genetic Biology*, v. 78, p. 55-58, 2015.
- ANDRADE, K. A. et al. *Cryptococcus* sp. Morphofunctional and Laboratory Aspects Evidenced in Cryptococcosis. *Revista de Patologia do Tocantins*, v. 4, p. 34-43, 2017.
- ARAÚJO NETO, L. M. et al. Síntese, citotoxicidade e atividade antifúngica de derivados de 5-nitro-tiofeno-tiossemicarbazonas. *Interações químico-biológicas*, v. 227, p. 172-181, 2017.
- ARAUJO-JUNIOR, E. C. et al. *Cryptococcus*: isolamento ambiental e caracterização bioquímica. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 67, p. 1003-1008, 2015.
- BACKES, P. et al. Diagnóstico laboratorial de *Cryptococcus* sp. no líquido. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 48, p. 10-14, 2016.
- BAHAR, H. et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genetics and Biology*, v. 78, p. 16-48, 2015.
- BANERJEE, A.; SHANNON, K. M. Leukemic transformation in patients with severe congenital neutropenia. *Journal Pediatric Hematology Oncology*, v. 23, p. 487-495, 2001.
- BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 14: medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. *Yeast*, v. 27, p. 875-904, 2010.
- BARONI, F. A. *Cryptococcus neoformans* isolados de torres de igrejas na cidade de Rio de Janeiro, RJ. Brasil. 2001. 159f. Tese (Doutorado em Microbiologia) -Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BELLMANN, R.; SMUSZKIEWICZ, P. Pharmacokinetics of antifungal drugs: practical implications for optimized treatment of patients. *Infection*, v. 45, p. 737-779, 2017.
- BENHAM, R. W. Cryptococci: Their Identification by Morphology and by Serology. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 57, p. 255-274, 1935.
- BENHAM, R. W. Cryptococcosis and blastomycosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 50, p. 1299-1314, 1950.

- BERMAS A.; GEDDES-MCALIESTER J. Combatting the evolution of antifungal resistance in *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, v. 114, p. 721–734, 2020.
- BICANIC, T.; HARRISON, T. S. Cryptococcal meningitis. *British Medical Bulletin*, v. 72, p. 99–118, 2005.
- BILUNG, L.M. et al. Evaluation of BOX-PCR and ERIC-PCR as Molecular Typing Tools for Pathogenic *Leptospira*. *Hindawi*, Id. 1351634, 2018.
- BOJARCZUK, A. et al. *Cryptococcus neoformans* Intracellular Proliferation and Capsule Size Determines Early Macrophage Control of Infection. *Scientific Reports*, v. 6, Id. 21489, 2016.
- BOWEN, A. et al. A Monoclonal Antibody to *Cryptococcus neoformans* Glucuronoxylomannan Manifests Hydrolytic Activity for Both Peptides and Polysaccharides. *The Journal Biological Chemistry*, v. 292, p. 417-434, 2017.
- BRASIL. Ministério Da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais (DIAHV). *Boletim epidemiológico de HIV e AIDS*. 2017. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2017/boletim-epidemiologico-hivaids-2017>>. Acesso em: 8 mar. 2020
- BRASIL. Ministério Da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais (DIAHV). *Boletim epidemiológico de HIV e AIDS*. 2018. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2018/boletim-epidemiologico-hivaids-2018>>. Acesso em: 8 mar. 2020
- BRASIL. Ministério Da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis – DCCI. *Boletim epidemiológico de HIV e AIDS*. Número especial. Dez. 2019. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2019/boletim-epidemiologico-de-hivaids-2019>>. Acesso em: 8 mar. 2020
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Vigilância e Epidemiológica da Criptococose - Brasília/ DF*, p. 1-18, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Meningite por outras etiologias. In: _____. *Guia de Vigilância em Saúde*. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. cap. 1, p. 65-68.
- BROOKS, G. F. et al. 2013. Cryptococcosis. In: _____. JAWETZ, M.; ADELBERG'S. *Medical Microbiology*. 26th ed. EUA: McGraw-Hill, v. 7, n. 3, p. 697-699.
- BUCHANAM, K. L.; MURPHY, J. W. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen?. *Emergency Infectious Diseases*, v. 4, p. 71-83, 1998.
- BUSSE, O. Uber parasitare Zelleinschlusse und ihre Zuchtung. *Centralbl. Bakt. Parasit.* v. 16, 1984.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*. American Society for Microbiology Press. Washington, p. 539-541, 1998.

CHANG, Y.C.; KOWN-CHUNG, K. J. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Molecular and Cellular Biology*, v. 14, p. 4912-4919, 1994.

CHEN, L. C.; BLANK, E. S.; CASADEVALL, A. Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, v. 3, p. 570–574, 1996.

CHEN, S. C. et al. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor. *The Journal of infectious diseases*, v. 175, p. 414–420, 1997.

CHEN, Y. et al. Increasing trend of fluconazole-non-susceptible *Cryptococcus neoformans* in patients with invasive cryptococcosis: a 12-year longitudinal study. *BMC Infectious Diseases*, v. 15, p. 277, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous yeasts*; approved standard, 3^a ed. 2008. CLSI document M27-A3. CLSI, Wayne, USA.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI. *Epidemiological Cutoff Values for Antifungal Susceptibility Testing*, clinical and laboratory standard institute, 2^a ed. 2018. CLSI supplement M59, Ed 2. CLSI, Wayne USA.

COELHO, C.; CASADEVALL, A. Cryptococcal therapies and drug targets: the old, the new and the promising. *Cellular Microbiology*, v. 18, p. 792–799, 2017.

COWEN, L. E. et al. Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 5, Id, a019752, 2015.

CURTIS, F. Contribution a l'étude de la saccharomycose humaine [Contribution to the study of human saccharomycosis]. *Annales de l'Institut Pasteur*, v. 10, p. 449–468, 1986.

DARZÉ, C. et al. Características clínicas laboratoriais de 104 casos de meningoencefalite criptocócica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 33, p. 21-26, 2000.

DEHGHAN, N. M.; RAHIMIAN, H. Assessment of genetic diversity of yeast isolates causing canker in stone fruit trees in some central provinces of Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, v. 2, n. 52, p. 2–23, 2016.

DERAY, G. Amphotericin B nephrotoxicity. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, v. 49, p. 37-41, 2002.

DESJARDINS, C. A. et al. Population genomics and the evolution of virulence in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Genome Research*, v. 27, p. 1207-1219, 2019.

DJORDJEVIC, J. T. Role of phospholipases in fungal fitness, pathogenicity, and drug development - lessons from *Cryptococcus neoformans*. *Frontiers in Microbiology*, v. 1, p. 1–13, 2010.

- DORNELES, E. M. S. et al. Evaluation of ERIC-PCR as Genotyping Method for *Corynebacterium pseudotuberculosis* Isolates. *PLoS One*, v. 9, n. 6, Id. e98758, 2014.
- DUAN, H. et al. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. *Environmental Research*, v. 109, n. 5, p. 511–517, 2009.
- DUIN, D. V. et al. Effects of Voriconazole on *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, p. 2014-2020, 2004.
- EISENMAN, H. C. et al. Microstructure of cell wall-associated melanin in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Biochemistry*, v. 44, p. 3683-3693, 2005.
- EISENMAN, H. C.; CASAVEVALL, A. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 93, p. 931–940, 2012.
- EL FANE, M. et al. Cryptococcosis during HIV infection. *Journal Mycologie Medicale*, v. 25, p. 257-62, 2015.
- ELLIS, D. H., PFFEIFER, T. J. Ecology, life cycle, and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. *The Lancet*, v. 336, p. 923-925, 1990b.
- ELLIS, D. H., PFFEIFER, T.J. Natural Habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Journal Clinical Microbiology*, v. 28, p. 1942-1644, 1990a.
- EMMONS, C. W. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. *Journal of Bacteriology*, v. 62, p. 685–690, 1951.
- ERICKSON, T. et al. Multiple virulence factors of *Cryptococcus neoformans* are dependent on VPH1. *Molecular Microbiology*, v. 42, p. 1121–1131, 2001.
- ESHER, S. K.; ZARAGOZA, O.; ALSPAUGH, J. A. Cryptococcal pathogenic mechanisms: a dangerous trip from the environment to the brain. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 113, Id. e180057, 2018.
- ESPINEL-INGROFF, A. et al. *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* Species Complex: an International Study of Wild-Type Susceptibility Endpoint Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, p. 5898-5906, 2012.
- ESPINELL-INGROFF, A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. *Revista Iberoamericana de Micologia*, v. 25, p. 101-106, 2008.
- EVANS, E. E. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*: 1. A serologic classification by means of the capsular and agglutination reactions. *Journal of Immunology*, v. 64, p. 423–430, 1950.
- EVANS, R. J. et al. Cryptococcal Phospholipase B1 Is Required for Intracellular Proliferation and Control of Titan Cell Morphology during Macrophage Infection. *Infection and Immunity*, v. 83, p. 1296–1304, 2015.

FALCI, D. R.; PASQUALOTTO, A. C. Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. *Clinical and Biomedical Research*, v. 35, p. 65-82, 2015.

FANG, W. et al. Tuberculosis/cryptococcosis co-infection in China between 1965 and 2016. *Emerging Microbes & Infections*, v. 6, p. 1-7, 2017.

FELIX-GONÇALVES, S. R. et al. Criptococose sistêmica em um canino da raça Miniatura Schnauzer. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 46, p. 300-305, 2018.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, p. 167-194, 2006.

FILIÚ, W. F. O. et al. Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, p. 591-595, 2002.

FIRACATIVE, C. et al. O status da criptococose na América Latina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 113, n. 7, Id. 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, Id. e37566, 2012.

FORTÚN, J. Actualización en terapia antifúngica: nuevos fármacos e indicaciones. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 29, p. 38–44, 2011.

FROTHINGHAM, L. A Tumor-Like Lesion in the Lung of a Horse caused by a *Blastomyces* (Torula). *The journal of the medical research*, v. 1, p. 31-43. 1902.

FUNDAÇÃO HOSPITALAR DO ESTADO DE MINAS GERAIS - FHEMIG. Diretrizes Clínicas – Protocolos Clínicos. Meningite Criptocócica. 2019. Disponível em: <http://www.fhemig.mg.gov.br/index.php?preview=1&option=com_dropfiles&format=&task=frontfile.download&catid=1394&id=14441&Itemid=1000000000000>. Acesso em: 20 mai. 2021.

GATTII, F.; ECKELS, R. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin. *Annales des Societe Belge de Medicine Tropicale*, v. 50, p. 689-694, 1970.

GAZZONI, A. F.; PEGAS, K. L.; SEVERO, L. C. Técnicas histopatológicas no diagnóstico de criptococose por *Cryptococcus* deficiente de cápsula: relato de caso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, p. 76-78, 2008.

GRECHI, J. et al. Glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* down-regulates the enzyme 6-Phosphofructo-1-kinase of Macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 286, p. 14820 –14829, 2011.

GROSSMAN, N. T.; CASADEVALL, A. Physiological Differences in *Cryptococcus neoformans* Strains *In Vitro* versus *In Vivo* and Their Effects on Antifungal Susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 61, Id. e02108-16, 2017.

- GULLO, F. P. et al. Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 32, p. 1377–1391, 2013.
- HAGEN, F. et al. Importance of Resolving Fungal Nomenclature: the Case of Multiple Pathogenic Species in the *Cryptococcus* Genus. *mSphere*, v. 2, n. 4, Id. e00238-17, 2017.
- HAMADANI, B. H. K. et al. Cryptococcosis and cryptococcal meningitis: New predictors and clinical outcomes at a United States academic medical centre. *Mycoses*, v. 61, n. 5, p. 314-320, 2018.
- HAMILL, R. J. Amphotericin B formulations: A Comparative Review of Efficacy and Toxicity. *Drugs*, v. 73, p. 919-934, 2013.
- HEITMAN, J. et al. 2011. *Cryptococcus from human pathogen to model yeasts*. 2nd ed. Washington: AMS Press, 620p.
- HOMMEL, B. et al. Titan cells formation in *Cryptococcus neoformans* is finely tuned by environmental conditions and modulated by positive and negative genetic regulators. *Plos pathogenes*, v. 14, Id. e1006982, 2018.
- IANISKI, L. B. et al. Perfil epidemiológico e terapêutico de pacientes com criptococose atendidos em hospital escola de Santa Maria/RS. *Revista Santa Maria*, v. 44, n. 2, 2018.
- JARVIS, J. N.; HARRISON, T. S. HIV-associated cryptococcal meningitis. *AIDS*, v. 21, p. 2119–2129, 2007.
- KHAWOCHAROENPORN, T.; APISARNTHANARAK, A.; MUNDY, L. M. Non neoformans cryptococcal infections: a systematic review. *Infection*, v. 35, p. 51-58, 2007.
- KON, A. S. et al. Consenso em criptococose – 2008. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. 5, p. 524-544, 2008.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. 1998. *The Yeasts: a taxonomic study*. 4^a edição. New York: ACM press: 1055p.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. 2011. *Cryptococcus*. In: *The yeasts: a taxonomic study*. 5^a ed. New York: ACM Press, p. 1661-1662.
- KWON-CHUNG K. J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 4, p. 1-27, 2014.
- KWON-CHUNG, K. J. A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia*, v. 67, p. 1197–1200, 1975.
- KWON-CHUNG, K. J. et al. The case for adopting the “species complex” nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis. *American Society for microbiology*, v. 2, p. 1-7, 2017.
- KWON-CHUNG, K. J., VARMA, A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Research*, 6, p. 574–587, 2006.

- KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Distribution of α and a mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. *American Journal of Epidemiology*, v. 108, p. 337-340, 1978.
- KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J. E. *Micologia médica*. Lea & Febiger, Filadélfia. 1992. 1933p.
- LACAZ, C. S. et al. 2002^a. Criptococose. In: *Tratado de Micologia Médica*, 9^a edição. Ed. Sarvier, p. 416-440.
- LIMA-NETO, R. G. et al. Aplicação de MALDI-TOF MS para requalificação de uma coleção de cultura de isolados clínicos de *Candida*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 45, n. 2, p.515-522, 2014.
- LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annual Review of Microbiology*, v. 8, p. 69-105, 2006.
- LITVINTSEVA, A. P. et al. Multilocus Sequence Typing Reveals Three Genetic Subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (Serotype A), Including a Unique Population in Botswana. *Genetics*, v. 172, p. 2223-2238, 2006.
- LOYSE, A. et al. Flucytosine and cryptococcosis: time to urgently address the worldwide accessibility of a 50-year-old antifungal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, p. 2435–2444, 2013.
- LYNDA, A. C.; INNOCENT, N. E. Epidemiology of *Cryptococcus* and cryptococcosis in Western Africa. *Mycoses*, v. 64, p. 4-14, 2020.
- MAHMOUDI, R. M. et al. Identification of *Candida* species associated with vulvovaginal candidiasis by multiplex PCR. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, v. 2012, Id. 872169, 2012.
- MARISOL, F. V. *Caracterización molecular mediante ERIC-PCR y REP-PCR de cepas de Cryptococcus Neoformans aisladas de pacientes VIH positivo*. 2019. 57f. Tese (Doutorado em Microbiologia e Parasitologia) - Facultad De Ciencias Biológicas, Hospital Regional Lambayeque, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Peru.
- MARTÍNEZ, A. F. Cryptococcosis and cryptococcal meningitis — new predictors and clinical outcomes at a united states academic medical center. *Mycoses*, v. 61, n. 5, p. 314–320, 2018.
- MARTINS, L. M. S. et al. Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piauí (northeastern Brazil). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 106, n. 6, p. 725-730, 2011.
- MAZIARZ, E. K.; JOHN R. M. D.; PERFECT, M. D. Cryptococcosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 30, n. 1, p. 179–206. 2016.
- MAZU, T. K. et al. The Mechanistic Targets of Antifungal Agents: An Overview. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 16, p. 555–578, 2016.

- MCCLELLAND, E. E. et al. The Role of Host Gender in the Pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* Infections. *Plos one*, v. 8, Id. e63632, 2013.
- MEYER, W. et al. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerging Infectious Diseases*, v. 9, p. 189-195, 2003.
- MEYER, W. et al. 2011. Molecular typing of the *Cryptococcus neoformans*/ *Cryptococcus gattii* species complex. In *Cryptococcus: From human pathogen to model yeast*. Ed. Heitman J, et al.), ASM, Washington, DC, v. 24, p. 327–357.
- MEZZARI, A. et al. Criptococose em um hospital público de porto alegre. *Journal Infect Control*, v. 2, n. 3, p. 135-139, 2013.
- 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, 2011.
- MISHRA, N. et al. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, v. 53, n. 3, p. 201-233, 2011.
- MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical Mycology Reviews*, v. 8, p. 515-548, 1995.
- MOORE, T. D.; EDMAN, J. C. The alpha-mating type locus of *Cryptococcus neoformans* contains a peptide pheromone gene. *Molecular and Cellular Biology*, v. 13, p. 1962-1970, 1993.
- MORA, D. J. et al. Clinical, Epidemiological and Outcome Features of Patients with Cryptococcosis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Mycopathologia*, v. 173, n. 5-6, p. 321-7, 2011.
- MOURAD, A.; PERFECT, J. R. The war on cryptococcosis: A Review of the antifungal arsenal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 113, Id. e170391, 2018.
- NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, v. 67, p. 400–428, 2003.
- NAYAK, J. B. et al. Cryptococcosis: A Garded Mycosis Threat. *Research Journal of Veterinary Sciences*, v. 3, p. 101-112, 2010.
- NEAL, L. M. et al. CD4⁺ T Cells Orchestrate Lethal Immune Pathology despite Fungal Clearance during *Cryptococcus neoformans* Meningoencephalitis. *American Society for Microiology*, v. 8, p. e01415-17, 2017.
- NEVES, W. W. et al. Incorporação do derivado 2-amino-tiofeno em nanopartículas: aumento da atividade antifúngica. *Revista Brasileira de Microbiologia*, v. 5, p. 647-655, 2020.
- NOONEY, L.; MATTHEWS, R. C.; BURNIE, J. P. Evaluation of Mycograb, anphotericin B, caspofungin, and fluconazole in combination against *Cryptococcus neoformans* by

checker board and time kill methodologies. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 51, p. 19-29, 2005.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cellular Microbiology*, v. 5, p. 203-223, 2003.

NUNES, J. O. et al. Cryptococcal meningitis epidemiology: 17 years of experience in a State of the Brazilian Pantanal. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 51, n. 4, p. 485-492, 2018.

OLSZEWSKI, M. A. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *The American journal of pathology*, v. 164, p. 1761–1771, 2004.

PAULA, D. A. J. et al. Occurrence and molecular characterization of cryptococcosis in dogs and cats in Mato Grosso, Brazil. *Pesquisa Brasileira Veterinária*, v. 34, p. 167-172, 2014.

PERFECT, J. R. Cryptococcosis: a model for the understanding of infectious diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 124, p. 1–5, 2014.

PERFECT, J. R.; BICANIC, T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. *Fungal Genetic Biology*, v. 78, p. 49-54, 2015.

PERFECT, J. R.; CASADEVALL, A. Cryptococcosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, v.16, p. 837-74, 2002.

PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 17, Id. e383–e392, 2017.

PINTO, L. I. S. A criptococose meníngea em doentes com infecção HIV. *Repositório Aberto*. Faculdade de Medicina do Porto. 2010.

PIZANI, A. T.; SANTOS, M. O. Criptococose em pacientes HIV positivos: revisão sistemática da literatura. *Revista Saúde Uni Toledo*, v. 1, p. 90-106, 2017.

PUTEROVÁ, Z.; KRUTOSIKOVÁ, A.; VÉGH, D. Applications Substituted 2-Aminothiophenes In Drug Design. *Nova Biotechnologica, Slovak Republic*, v. 9, n. 2, p. 167-173, 2009.

PUTIGNANI, L. et al. MALDI-TOF espectrometria de massa fenotipagem proteômica de fungos clinicamente relevantes. *Molecular BioSystems*, v. 7, n. 3, p. 620-9, 2011.

PYRGOS, V. et al. Epidemiology of cryptococcal meningitis in the US: 1997-2009. *Plos one*, v. 8, Id. e56269, 2013.

RAPPLEYE, C. A.; GOLDMAN, W. E. Defining Virulence Genes in the Dimorphic Fungi. *Annual Review of Microbiology*, v. 60, p. 281–303, 2006.

RÊGO, M. F. Análise bibliográfica dos principais aspectos da criptococose Bibliographical analysis of main aspects of cryptococcosis. *Brazilian Journal of health Review, Curitiba*, v. 2, n. 4, p. 3797-3807, 2019.

- REOLON, A.; PEREZ, R. L. L.; MEZZARI, A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 40, p. 293-298, 2004.
- REVIE, N. M. et al. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. *Current Opinion in Microbiology*, v. 45, p. 70–76, 2018.
- RIBAS, R. C.; BAEZA, L. C.; RIBEIRO, F. H. M. Isolation of *Cryptococcus* spp. in excrements of pigeons (*Columba* sp.) in the Maringa city, PR, Brazil. *Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar*, v. 15, p. 45-50, 2011.
- RICETO, E. B. M. et al. Enzymatic and hemolytic activity in different *Candida* species. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 32, p. 79–82, 2015.
- ROBBINS, N.; CAPLAN, T.; COWEN, L. E. Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. *Annual Review of Microbiology*, v. 71, p. 753–775, 2017.
- ROEMER, T.; KRYSAN, D. J Antifungal Drug Development: Challenges, Unmet Clinical Needs, and New Approaches. *Cold Spring Harb Perspectives in Medicine*, v. 4, p. 1–14, 2014.
- RUTHERFORD, J. C. The Emerging Role of Urease as a General Microbial Virulence Factor. *PLoS Pathogens*, v. 10, p. 1–3, 2014.
- SAMARASINGHE, H. et al. Genetic Factors and Genotype-Environment Interactions Contribute to Variation in Melanin Production in the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Scientific Reports*, v. 8, p. 1-11, 2018.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY, USA, Cold Spring Harbor Laboratory, 2010p.
- SANFELICE F. Contributo alla morfologia e biologia dei blastomiceti che si sviluppano nei succhi de alcuni frutti. *Annali di igiene : medicina preventiva e di comunita*, v. 4, p 463–469, 1984.
- SANTOS, J. et al. Identification and molecular analysis of yeasts found in domestic pigeon droppings in Montes Claros, MG, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, v. 19, n. 1, 2020.
- SATIE-KON, A. et al. Consenso em criptococose – 2008. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, p. 524-544, 2008.
- SATISHCHANDRA, P. et al. Cryptococcal meningitis: Clinical, diagnostic and therapeutic overviews. *Neurology India*, v. 55, p. 226-232, 2007.
- SAVARI, M. et al. Characterization of toxin-antitoxin (TA) systems in *Pseudomonas aeruginosa* clinic isolates in Iran". *Jundishapur Journal of Microbiology*, v. 9, n. 1, Id. e26627, 2016.
- SEVERO, C. B.; GAZZONI, A. F.; SEVERO, L. C. Capítulo 3: Criptococose pulmonar. *Jornal brasileiro de pneumologia*, v. 35, p.1136-1144, 2009.

- SHAHEEN, A. A. et al.. Epidemiology and trends of cryptococcosis in the United States from 2000 to 2007: A population-based study. *International Journal of STD & AIDS*, v. 29, p. 453-460, 2018.
- STATE, P. I. et al. Genotypic characterization of *Enterobacter sakazakii* isolates by PFGE, BOX-PCR and sequencing of the *fliC* gene. *Journal of applied microbiology*, v 104, n. 1, p. 26-34, 2008.
- SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 75, p. 213-267, 2011.
- SHI, M. et al. Real-time imaging of trapping and urease- dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 120, p. 1683–1693, 2010.
- SILVA, J. O.; CAPUANO, D. M. Ocorrência de *Cryptococcus* spp e de parasitas de interesse em saúde pública, nos excretas de pombos na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. *Revista do Instituto Adolf Lutz*, v. 67, p. 137-141, 2008.
- SILVA, M. A. P.; GAGLIANI, L. H. Diagnóstico e prevalência da meningite criptocócica em pacientes portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida –SIDA. *Revista UNILUS Ensino e Pesquisa*, v. 11 n. 2, p. 23-42, 2014.
- SILVEIRA, M. B. et al. Diagnóstico Laboratorial de Criptococose Em Indivíduos Imunodeprimidos. *Saúde & Ciência em Ação – Revista Acadêmica do Instituto de Ciências da Saúde*, v. 4, n. 1, 2018.
- SIONOV, E. et al. *Cryptococcus neoformans* overcomes stress of azole drugs by formation of disomy in specific multiple chromosomes. *PLoS pathogens*, v. 6, Id. e1000848, 2010.
- SLOAN, D. J.; PARRIS, V. Cryptococcal meningitis: epidemiology and therapeutic options. *Clinical Epidemiology*, v.13, p. 189-183, 2014.
- SMITH, K.D. et al. Increased Antifungal Drug Resistance in Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* in Uganda. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 59, p. 7197-7204, 2015.
- SMITH, L. M.; DIXON, E. F.; MAY, R. C. The fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* manipulates macrophage phagosome maturation. *Cellular Microbiology*, v. 17, n. 1, p. 702-713, 2015.
- SOARES, E. A. et al. Mortality by cryptococcosis in Brazil from 2000 to 2012: A descriptive epidemiological study. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 13, n. 7, Id. e0007569, 2019.
- 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, p. 1-19, 2016.

- SPRINGER, D. J. et al. *Cryptococcus gattii* VGIII Isolates Causing Infections in HIV/AIDS Patients in Southern California: Identification of the Local Environmental Source as Arboreal. *Plos pathogens*, v. 10, Id. 1004285, 2014.
- SRIKANTRA, D.; SANTIAGO-TIRADO, F. H.; DOERING, T. L. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. *Yeast*, v. 31, p. 47-60, 2014.
- STAIB, F. *Cryptococcus neoformans* and *Guizotia abyssinica* (*syn. G. oleífera*) Farbreaktion fur (*Cryptococcus neoformans*). *Zentrabl Bakteriologie*, v. 148, p. 466-475, 1962.
- TAKAHARA, D. T. et al. Primeiro registro de *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos provenientes de locais públicos e residenciais de área metropolitana de Cuiabá, Estado do Mato Grosso, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 55, p. 371-376, 2013.
- TARUMOTO, N. et al. Identification of disseminated cryptococcosis using MALDI-TOF MS and clinical evaluation. *Medical Mycology Journal*, v. 57, p. 41-46, 2016.
- TELLES, M., R; SOUZA, E., B., A. Criptococose: Incidência, Diagnóstico e Tratamento. *Saber Científico*, Porto Velho, 2017.
- TELLO, M. Criptococosis. *Revista Médica Risaralda*, v. 19, p. 147-153, 2013.
- THOMAZ, D. Y. et al. Does the Capsule Interfere with Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*? *Journal of Clinical Microbiology*, v. 54, p. 474-477, 2016.
- UMEYAMA, T. et al. Determination of Epidemiology of Clinically Isolated *Cryptococcus neoformans* Strains in Japan by Multilocus Sequence Typing. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, v. 66, p. 51-55, 2013.
- VALDÉS, B. S. G.. Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia*, v. 39, n. 2, 2005.
- VANBREUSEGHEM, R.; TAKASHIO, M. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin. *Annales des Societe Belge de Medicine Tropicale*, v. 50, p. 695-702, 1970.
- VEEN, V. S. Q.; CLAAS, E. C.; KUIJPER, E. J. Identificação de alta produtividade de bactérias e leveduras por espectrometria de massa de dessorção a laser assistida por matriz e tempo de vôo em laboratórios convencionais de microbiologia médica. *Journal Clinical of Microbiology*, v. 48, n. 3, p. 900-7, 2010.
- VERMES, A.; GUCHELAAR, H. J.; DANKERT, J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 46, p.171–179, 2000.
- VERSÉ, M. Uber einen Fall von generalisierter Blastomykose beim menschen [About a case of generalized human blastomycosis]. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie*, v. 17, p. 275–278, 1914.

- VIEIRA JUNIOR, J. N. *Estudo clínico-epidemiológico da meningite criptocócica em pacientes HIV negativos em um Centro de Referência no Piauí*. 2015. 82f. Dissertação (Mestrado em Medicina tropical) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós Graduação em Medicina Tropical, Teresina.
- VIDOTTO, V. et al. Extracellular activity in *Cryptococcus neoformans* strains isolated from AIDS patients and from environmental sources. *Revista iberoamericana de micologia*, v. 17, p. 14–9, 2000.
- WHITNEY, L. et al. Effectiveness of an antifungal stewardship programme at a London teaching hospital 2010–16. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 74, p. 234–241, 2019.
- WILLIAMSON, P. R. et al. Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. *Nature Reviews Neurology*, v. 13, n. 1, p. 13–24, 2016.
- WILLIAMSON, P.R. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: Identification as a laccase. *Journal of Bacteriology*, v. 176, p. 656-664, 1998.
- WILSON, D. E.; BENNETT, J. E.; BAILEY, J. W. Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 127, p. 820–823, 1968.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Rapid advice: diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children*. World Health Organization. 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/iris/handle/10665/44786>>. Acesso em: 20 Maio 2021
- ZARAGOZA, O. et al. Chapter 4: The Capsule of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Advances in applied Microbiology*, v. 68, p. 133-216, 2009.
- ZHAO, Y. et al. Life Cycle of *Cryptococcus neoformans*. *Annual Review of Microbiology*, v. 73, p. 1-26, 2019.
- ZHU, F. et al. Drug discovery prospect from untapped species: indications from approved natural product drugs. *PLoS One*, v. 7, Id. e39782, 2012.
- ZVEZDANOVA, M. E. et al. Implementation of MALDI-TOF Mass Spectrometry and Peak Analysis: Application to the Discrimination of *Cryptococcus neoformans* Species Complex and Their Interspecies Hybrids. *Fungi*, v. 6, n. 4, p. 330, 2020.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Journal of Medical Mycology

TUBERCULOSIS AND NEUROCRYPTOCOCCOSIS BY *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* IN A NON-HIV PATIENT: A COMORBIDITIES CASE REPORT

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	MYCMED-D-21-00014
Article Type:	Case Report
Keywords:	Cryptococcus; Cryptococcosis; Co-infection; Tuberculosis; Non-HIV patient.
Corresponding Author:	Reginaldo Gonçalves Lima-Neto, Ph.D. Universidade Federal de Pernambuco Recife, BRAZIL
First Author:	Ertênia Paiva Oliveira, M.Sc.
Order of Authors:	Ertênia Paiva Oliveira, M.Sc. Cícero Pinheiro Inácio, Ph.D. Jucieli Firmino Freitas, M.Sc. Carlos Alberto Tiburcio Valeriano, Ph.D. Rejane Pereira Neves, Ph.D. Paulo Moscovô da Veiga Pessoa Sobrinho, M.Sc. Reginaldo Gonçalves Lima-Neto, Ph.D.
Abstract:	<p><i>Mycobacterium tuberculosis</i> which is responsible for tuberculosis (TB) and <i>Cryptococcus</i> sp. responsible for cryptococcosis are pathogenic microorganisms that especially affect patients infected with the human immunodeficiency virus (HIV). Both diseases present similar classic symptoms, which makes diagnosis and treatment consequently difficult. To our knowledge, a few reported cases of <i>M. tuberculosis</i> and <i>Cryptococcus</i> sp. co-infection in non-HIV patients exist. This study reports a TB and neurocryptococcosis (NC) comorbidity case in a patient who had no clinical or serological evidence of HIV-compromised immunity. A 49-year-old male patient, a farmer with a low education level, previously diagnosed with TB and was undergoing treatment for a month when he presented progressive headaches, fever, drowsiness and photosensitivity, a stiff neck and a positive Lasègue test. During hospitalization, the patient was also diagnosed with NC through a cerebrospinal fluid (CSF) analysis which revealed the presence of capsulated yeasts by contrast with china/india ink. Following the yeast isolation, proteomic and molecular analyzes were performed. The patient received antifungal therapy in parallel with TB treatment, which caused complications and had to be modified twice. However, after three months of hospitalization the patient was discharged. Co-infection with tuberculosis and cryptococcosis is a clinical and laboratory challenge, often leading to a delay in diagnosis. In this paper we emphasize the need to understand these infectious comorbidities in non-HIV and South America patients, since the few cases reported in the literature are from studies conducted in the United States and China.</p>

APÊNDICE B

Mycoses



Cryptococcosis: clinical-epidemiological and demographic features and genetic relationship among clinical yeasts.

Journal:	<i>Mycoses</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Oliveira, Ertênia; Federal University of Pernambuco, Mycology Sousa, Bruna; Federal University of Pernambuco, Mycology Freitas, Jucieli; Federal University of Pernambuco, Mycology Neves, Rejane; Federal University of Pernambuco, Mycology Jucá, Moacir; Department of Health from Pernambuco State, Committee on Hospitalar Infection Control Lobo, Jailton; Federal University of Pernambuco, Tropical Medicine Maciel, Maria Amélia; Federal University of Pernambuco, Tropical Medicine Lima-Neto, Reginaldo; Federal University of Pernambuco, Tropical Medicine
Keywords:	Cryptococcus neoformans, antifungal susceptibility, genotyping, epidemiology
Area of Expertise:	Antifungal Susceptibility, Fungal Taxonomy, Laboratory Diagnostics
Additional Keywords:	

SCHOLARONE™
Manuscripts

APÊNDICE C

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(PARA MENORES DE 12 a 18 ANOS - Resolução 466/12)**

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa (*Cryptococcus*: Determinação do Perfil Clínico-Demográfico de Pacientes Imunocomprometidos Atendidos em unidades de saúde pública do Pernambuco). Esta pesquisa é de responsabilidade da pesquisadora Ertênia Paiva Oliveira, Rua: Padre Champagnat, 120, várzea, CEP: 50740-320, Recife-PE; Telefone (81-998913505), e-mail: oliveiraertenia@gmail.com, inclusive ligações a cobrar e está sob a orientação do: Prof. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto- Telefone para contato: (81 2126 8525), e-mail: goncalves_reginaldo@hotmail.com.

Caso este Termo de Consentimento contenha informação que não lhe seja compreensíveis, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados e concorde com a realização do estudo pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue para que seus pais ou responsável possam guardá-la e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Você será esclarecido (a) sobre qualquer dúvida e estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu. Para participar deste estudo, o responsável por você deverá autorizar e assinar um Termo de Consentimento, podendo retirar esse consentimento ou interromper a sua participação a qualquer momento, sem nenhum prejuízo.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- Descrição da pesquisa: Esta pesquisa tem como objetivo realizar levantamento epidemiológico da criptococose (infecção fungica) em pacientes imunocomprometidos (imunidade baixa) em hospitais localizados no Pernambuco, possibilitando o diagnóstico e promovendo posteriormente uma avaliação *in vitro* do potencial antifúngico comercialmente disponíveis bem como a utilização de derivados de tiofenos (moléculas a serem testadas), além da identificação proteômica e molecular para identificação de novas variedades do complexo *Cryptococcus*.

➤ Esclarecimento do período de participação do voluntário na pesquisa: A coleta de dados só se iniciará após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do CCS/UFPE. Haverá a coleta de material biológico (LCR-líquido cefalorraquidiano). A coleta do LCR será realizado por equipe médica através de uma punção lombar, em ambiente hospitalar. Esse material será encaminhado para o laboratório de Micologia Médica- no Departamento de Micologia/ UFPE, para posteriormente ser realizado o diagnóstico micológico laboratorial. As coletas serão realizadas conforme a solicitação médica.

➤ **RISCOS diretos** para o voluntário:

Os riscos, quando houver, serão mínimos, pois a coleta das amostras biológicas será realizada por profissionais qualificados e habilitados. Serão utilizados para o desenvolvimento da referida pesquisa apenas amostras biológicas de pacientes que tiverem solicitação médica para diagnóstico micológico, independente de execução do projeto. Adicionalmente, o pesquisador se compromete com a manipulação do material de forma adequada e segura. Além disto, o pesquisador se compromete com a manipulação adequada e confidencialidade dos dados coletados conforme declaração anexada na plataforma brasil. O único risco direto será, caso ocorra, constrangimento no momento da solicitação da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). No entanto, será esclarecido ao paciente sobre o direito de não querer participar da pesquisa ou de desistir em qualquer etapa da mesma.

➤ **BENEFÍCIOS diretos e indiretos** para os voluntários:

O trabalho contribuirá com o diagnóstico de confiança, podendo assim traçar um perfil epidemiológico desta micose oportunista que é a criptococose (infecção fúngica), além da identificação molecular das novas espécies em descoberta, bem como a realização de perfil de sensibilidade, tendo em vista o número limitado dos antifúngicos comercializados, visando assim tratamentos mais eficazes.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (idade, sexo, doença de base, uso de medicamentos, etc), ficarão armazenados em (pastas de arquivo no computador pessoal do pesquisador responsável), sob a responsabilidade do (Ertênia Paiva Oliveira), no endereço (acima informado) e sob responsabilidade de Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto, no

endereço, Rua: prof. Morais Rego, 1235-cidade universitária, CEP: 50670-901, Recife-PE, tel: (81) 2126 8959, pelo período de mínimo 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br)**.

Assinatura do pesquisador (a)

ASSENTIMENTO DO(DA) MENOR DE IDADE EM PARTICIPAR COMO VOLUNTÁRIO(A)

Eu, _____, portador (a) do documento de Identidade _____ (se já tiver documento), abaixo assinado, concordo em participar do estudo “*Cryptococcus*: Determinação do Perfil Clínico-Demográfico de Pacientes Imunocomprometidos Atendidos em unidades de saúde pública do Pernambuco” como voluntário (a). Fui informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, o que vai ser feito,

APÊNDICE D



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa (*Cryptococcus*: Determinação do Perfil Clínico-Demográfico de Pacientes Imunocomprometidos Atendidos em unidades de saúde pública do Pernambuco). Esta pesquisa é de responsabilidade da pesquisadora Ertênia Paiva Oliveira Rua: Padre Champagnat, 120, várzea, CEP: 50740-320, Recife-PE; Telefone (81- 998913505), e-mail: oliveiraertenia@gmail.com, inclusive ligações a cobrar e está sob a orientação do: Prof. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto- Telefone para contato: (81 2126 8525), e-mail: [goncalves_reginaldo@hotmail.com](mailto:gonalves_reginaldo@hotmail.com)

Caso este Termo de Consentimento contenha informação que não lhe seja compreensível, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados e concorde com a realização do estudo pedimos que rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue para que seus pais ou responsável possam guardá-la e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Você será esclarecido (a) sobre qualquer dúvida e estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu. Para participar deste estudo, o responsável por você deverá autorizar e assinar um Termo de Consentimento, podendo retirar esse consentimento ou interromper a sua participação a qualquer momento, sem nenhum prejuízo.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- Descrição da pesquisa: Esta pesquisa tem como objetivo realizar levantamento epidemiológico da criptococose (infecção fungica) em pacientes imunocomprometidos (imunidade baixa) em hospitais no Pernambuco, possibilitando o diagnóstico e promovendo posteriormente uma avaliação *in vitro* do potencial antifúngico comercialmente disponíveis bem como a utilização de derivados de tiofenos (moléculas a serem testadas), além da identificação proteômica e molecular para identificação de novas variedades do complexo *Cryptococcus*.
- Esclarecimento do período de participação do voluntário na pesquisa: A coleta de dados só se iniciará após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do CCS/UFPE. Haverá a coleta de material biológico (LCR-líquido cefalorraquidiano). A coleta do LCR

será realizado por equipe médica através de uma punção lombar, em ambiente hospitalar. Esse material será encaminhado para o laboratório de Micologia Médica- no Departamento de Micologia/ UFPE, para posteriormente ser realizado o diagnóstico micológico laboratorial. As coletas serão realizadas conforme a solicitação médica.

➤ **RISCOS diretos** para o voluntário:

Os riscos, quando houver, serão mínimos, pois a coleta das amostras biológicas será realizada por profissionais qualificados e habilitados. Serão utilizados para o desenvolvimento da referida pesquisa apenas amostras biológicas de pacientes que tiverem solicitação médica para diagnóstico micológico, independente de execução do projeto. Adicionalmente, o pesquisador se compromete com a manipulação do material de forma adequada e segura. Além disto, o pesquisador se compromete com a manipulação adequada e confidencialidade dos dados coletados conforme declaração anexada na plataforma brasil. O único risco direto será, caso ocorra, constrangimento no momento da solicitação da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). No entanto, será esclarecido ao paciente sobre o direito de não querer participar da pesquisa ou de desistir em qualquer etapa da mesma.

➤ **BENEFÍCIOS diretos e indiretos** para os voluntários.

O trabalho contribuirá com o diagnóstico de confiança, podendo assim traçar um perfil epidemiológico desta micose oportunista que é a criptococose (infecção fúngica), além da identificação molecular das novas espécies em descoberta, bem como a realização de perfil de sensibilidade, tendo em vista o número limitado dos antifúngicos comercializados, visando assim tratamentos mais eficazes.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (idade, sexo, doença de base, uso de medicamentos, etc), ficarão armazenados em (pastas de arquivo no computador pessoal do pesquisador responsável), sob a responsabilidade do (Ertênia Paiva Oliveira), no endereço (acima informado), e sob responsabilidade de Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto, no endereço, Rua: prof. Moraes Rego, 1235-cidade universitária, CEP: 50670-901, Recife-PE, tel: (81) 2126 8959, pelo período de mínimo 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidos pelos pesquisadores

(ressarcimento de transporte e alimentação). Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

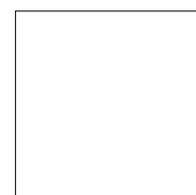
Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br)**

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, pelo meu representante legal, após a escuta da leitura deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo (*Cryptococcus*: Determinação do Perfil Clínico-Demográfico de Pacientes Imunocomprometidos Atendidos em unidades de saúde pública do Pernambuco), como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento).

Local e data _____

Assinatura do participante: _____



Impressão digital

(opcional)

Presenciamos a solicitação de assentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do/a voluntário/a em participar. 02 testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

APÊNDICE E



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA ADULTOS IMPOSSIBILITADOS DE ASSINAR O TCLE - Resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa (*Cryptococcus*: Determinação do Perfil Clínico-Demográfico de Pacientes Imunocomprometidos Atendidos em unidades de saúde pública do Pernambuco). Esta pesquisa é de responsabilidade da pesquisadora Ertênia Paiva Oliveira, Rua: Padre Champagnat, 120, várzea, CEP: 50740-320, Recife-PE; Telefone (81- 998913505), e-mail: oliveiraertenia@gmail.com, inclusive ligações a cobrar e está sob a orientação do: Prof. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto- Telefone para contato: (81 2126 8525), e-mail: goncalves_reginaldo@hotmail.com.

Caso este Termo de Consentimento contenha informação que não lhe seja compreensível, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados e concorde com a realização do estudo pedimos que rubricue as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue para que seus pais ou responsável possam guardá-la e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Você será esclarecido (a) sobre qualquer dúvida e estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu. Para participar deste estudo, o responsável por você deverá autorizar e assinar um Termo de Consentimento, podendo retirar esse consentimento ou interromper a sua participação a qualquer momento, sem nenhum prejuízo.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- Descrição da pesquisa: Esta pesquisa tem como objetivo realizar levantamento epidemiológico da criptococose (infecção fungica) em pacientes imunocomprometidos (imunidade baixa) em hospitais localizados no Pernambuco, possibilitando o diagnóstico e promovendo posteriormente uma avaliação *in vitro* do potencial antifúngico comercialmente disponíveis bem como a utilização de derivados de tiofenos (moléculas a serem testadas), além da identificação proteômica e molecular para identificação de novas variedades do complexo *Cryptococcus*.
- Esclarecimento do período de participação do voluntário na pesquisa: A coleta de dados só se iniciará após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do CCS/UFPE. Haverá a coleta de material biológico (LCR-líquido cefalorraquidiano). A coleta do LCR será realizado por equipe médica através de uma punção lombar, em ambiente

hospitalar. Esse material será encaminhado para o laboratório de Micologia Médica- no Departamento de Micologia/ UFPE, para posteriormente ser realizado o diagnóstico micológico laboratorial. As coletas serão realizadas conforme a solicitação médica.

➤ **RISCOS diretos** para o voluntário:

Os riscos, quando houver, serão mínimos, pois a coleta das amostras biológicas será realizada por profissionais qualificados e habilitados. Serão utilizados para o desenvolvimento da referida pesquisa apenas amostras biológicas de pacientes que tiverem solicitação médica para diagnóstico micológico, independente de execução do projeto. Adicionalmente, o pesquisador se compromete com a manipulação do material de forma adequada e segura. Além disto, o pesquisador se compromete com a manipulação adequada e confidencialidade dos dados coletados conforme declaração anexada na plataforma brasil. O único risco direto será, caso ocorra, constrangimento no momento da solicitação da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). No entanto, será esclarecido ao paciente sobre o direito de não querer participar da pesquisa ou de desistir em qualquer etapa da mesma.

➤ **BENEFÍCIOS diretos e indiretos** para os voluntários.

O trabalho contribuirá com o diagnóstico de confiança, podendo assim traçar um perfil epidemiológico desta micose oportunista que é a criptococose (infecção fúngica), além da identificação molecular das novas espécies em descoberta, bem como a realização de perfil de sensibilidade, tendo em vista o número limitado dos antifúngicos comercializados, visando assim tratamentos mais eficazes.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (idade, sexo, doença de base, uso de medicamentos, etc), ficarão armazenados em (pastas de arquivo no computador pessoal do pesquisador responsável), sob a responsabilidade do (Ertênia Paiva Oliveira), no endereço (acima informado), e sob responsabilidade de Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto, no endereço, Rua: prof. Morais Rego, 1235-cidade universitária, CEP: 50670-901, Recife-PE, tel: (81) 2126 8959, pelo período de mínimo 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidos pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Fica também garantida indenização em

casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).**

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, pelo meu representante legal, após a escuta da leitura deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo (*Cryptococcus*: Determinação do Perfil Clínico-Demográfico de Pacientes Imunocomprometidos Atendidos em unidades de saúde pública do Pernambuco), como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento).

A rogo de _____, que é (não alfabetizado/juridicamente incapaz/ deficiente visual), eu _____ assino o presente documento que autoriza a sua participação neste estudo.

Assinatura _____

Local e data: _____



Presenciamos a solicitação de assentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do/a voluntário/a em participar. 02 testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

APÊNDICE F



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA RESPONSÁVEL LEGAL PELO MENOR DE 18 ANOS - Resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa (*Cryptococcus*: Determinação do Perfil Clínico-Demográfico de Pacientes Imunocomprometidos Atendidos em unidades de saúde pública do Pernambuco). Esta pesquisa é de responsabilidade da pesquisadora Ertênia Paiva Oliveira, Rua: Padre Champagnat, 120, várzea, CEP: 50740-320, Recife-PE; Telefone (81- 998913505), e-mail: oliveiraertenia@gmail.com, inclusive ligações a cobrar e está sob a orientação do: Prof. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto- Telefone para contato: (81 2126 8525), e-mail: goncalves_reginaldo@hotmail.com.

Caso este Termo de Consentimento contenha informação que não lhe seja compreensíveis, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados e concorde com a realização do estudo pedimos que rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue para que seus pais ou responsável possam guardá-la e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Você será esclarecido (a) sobre qualquer dúvida e estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu. Para participar deste estudo, o responsável por você deverá autorizar e assinar um Termo de Consentimento, podendo retirar esse consentimento ou interromper a sua participação a qualquer momento, sem nenhum prejuízo.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- Descrição da pesquisa: Esta pesquisa tem como objetivo realizar levantamento epidemiológico da criptococose (infecção fungica) em pacientes imunocomprometidos (imunidade baixa) em hospitais no Pernambuco, possibilitando o diagnóstico e promovendo posteriormente uma avaliação *in vitro* do potencial antifúngico comercialmente disponíveis bem como a utilização de derivados de tiofenos (moléculas a serem testadas), além da identificação proteômica e molecular para identificação de novas variedades do complexo *Cryptococcus*.
- Esclarecimento do período de participação do voluntário na pesquisa: A coleta de dados só se iniciará após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do CCS/UFPE.

Haverá a coleta de material biológico (LCR-líquido cefalorraquidiano). A coleta do LCR será realizado por equipe médica através de uma punção lombar, em ambiente hospitalar. Esse material será encaminhado para o laboratório de Micologia Médica- no Departamento de Micologia/ UFPE, para posteriormente ser realizado o diagnóstico micológico laboratorial. As coletas serão realizadas conforme a solicitação médica.

➤ **RISCOS diretos** para o voluntário:

Os riscos, quando houver, serão mínimos, pois a coleta das amostras biológicas será realizada por profissionais qualificados e habilitados. Serão utilizados para o desenvolvimento da referida pesquisa apenas amostras biológicas de pacientes que tiverem solicitação médica para diagnóstico micológico, independente de execução do projeto. Adicionalmente, o pesquisador se compromete com a manipulação do material de forma adequada e segura. Além disto, o pesquisador se compromete com a manipulação adequada e confidencialidade dos dados coletados conforme declaração anexada na plataforma brasil. O único risco direto será, caso ocorra, constrangimento no momento da solicitação da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). No entanto, será esclarecido ao paciente sobre o direito de não querer participar da pesquisa ou de desistir em qualquer etapa da mesma.

➤ **BENEFÍCIOS diretos e indiretos** para os voluntários:

O trabalho contribuirá com o diagnóstico de confiança, podendo assim traçar um perfil epidemiológico desta micose oportunista que é a criptococose (infecção fúngica), além da identificação molecular das novas espécies em descoberta, bem como a realização de perfil de sensibilidade, tendo em vista o número limitado dos antifúngicos comercializados, visando assim tratamentos mais eficazes.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (idade, sexo, doença de base, uso de medicamentos, etc), ficarão armazenados em (pastas de arquivo no computador pessoal do pesquisador responsável), sob a responsabilidade do (Ertênia Paiva Oliveira), no endereço (acima informado), e sob responsabilidade de Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto, no endereço, Rua: prof. Moraes Rego, 1235-cidade universitária, CEP: 50670-901, Recife-PE, tel: (81) 2126 8959, pelo período de mínimo 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).**

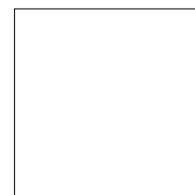
CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, responsável por _____, abaixo assinado, pelo meu representante legal, após a escuta da leitura deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo (*Cryptococcus*: Determinação do Perfil Clínico-Demográfico de Pacientes Imunocomprometidos Atendidos em unidades de saúde pública do Pernambuco), como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Local e data _____

Assinatura do participante: _____

Impressão digital



(opcional)

Presenciamos a solicitação de assentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do/a voluntário/a em participar. 02 testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

APÊNDICE G

TERMO DE COMPROMISSO E CONFIDENCIALIDADE

Título do projeto: "CRYPTOCOCCUS: DETERMINAÇÃO DO PERFIL CLÍNICO-DEMOGRÁFICO DE PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS ATENDIDOS EM UNIDADES DE SAÚDE PÚBLICA DO PERNAMBUCO"

Pesquisador responsável: Ertênia Paiva Oliveira

Instituição/Departamento de origem do pesquisador: Universidade Federal de Pernambuco

Telefone para contato: (81) 2126 8525

E-mail: oliveiraertenia@gmail.com

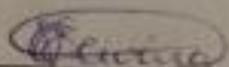
O(s) pesquisador (es) do projeto acima identificado(s) assume(m) o compromisso de:

- Preservar o sigilo e a privacidade dos voluntários cujos dados coletados e materiais biológicos serão estudados;
- Assegurar que as informações e materiais biológicos serão utilizados, única e exclusivamente, para a execução do projeto em questão;
- Assegurar que os resultados da pesquisa somente serão divulgados de forma anônima, não sendo usadas iniciais ou quaisquer outras indicações que possam identificar o voluntário da pesquisa.

O(s) pesquisador (es) declara(m) que os dados coletados nesta pesquisa (fotos), ficarão armazenados em pastas de arquivo no computador pessoal, sob a responsabilidade do pesquisador responsável e do orientador: Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto, (81) 2126 8525, no endereço Av. Prof. Moraes Rego, s/n Cidade Universitária – Recife/PE – 50.670.901, Recife-PE, pelo período de mínimo 5 anos.

O(s) Pesquisador(es) declara(m), ainda, que a pesquisa só será iniciada após a avaliação e aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco – CEP/CCS/UFPE.

Recife, 25 de Setembro de 2017



Ertênia Paiva Oliveira
Assinatura do Pesquisador Responsável

APÊNDICE H

INSTRUMENTO PARA COLETA DE DADOS DO PRONTUÁRIO

1. Dados do Paciente

1. Nome do Paciente: _____
2. Idade: _____ Sexo: _____ Profissão: _____ Telefone () _____ - _____

2. Dados da Internação

1. Data da internação: _____ hora da internação: _____
2. Doença de base: _____
3. Qual Hospital foi internado: _____
4. Setor que foi encaminhado no ato da internação: _____
5. Hipótese (s) diagnóstico (s): _____
6. Exame (s) solicitado (s):

7. Tratamento:

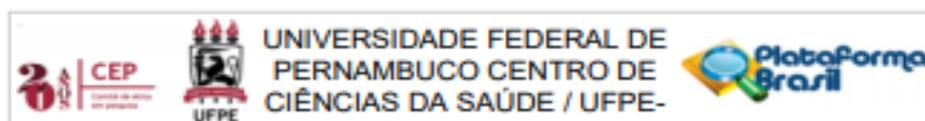
8. Evolução do paciente:

9. Tipo de saída do hospital: **A.** Alta; Data da alta: _____ **B.** óbito; Data do óbito: _____

ANEXOS

ANEXO A

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA-CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CRYPTOCOCCUS: DETERMINAÇÃO DO PERFIL CLÍNICO-DEMOGRÁFICO DE PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS ATENDIDOS EM UNIDADES DE SAÚDE PÚBLICA DO PERNAMBUCO

Pesquisador: Ertânia Paiva Oliveira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 77503417.4.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.415.316

Apresentação do Projeto:

O projeto trata de pesquisa de doutorado intitulada "Cryptococcus: Determinação do Perfil ClínicoDemográfico

de Pacientes Imunocomprometidos Atendidos em Unidades de Saúde Pública de

Pernambuco" do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Centro de Biotecnologia que tem

como pesquisadora responsável Ertânia Paiva Oliveira, a qual será orientada pelo Professor Reginaldo

Gonçalves de Lima Neto do Departamento de Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde. O

trabalho será desenvolvido no Hospital das Clínicas e Hospital Correia Picanço.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário

Diagnosticar e caracterizar epidemiologicamente os casos de criptococose em pacientes internados em duas Unidades de Saúde Pública Terciária, identificar a diversidade e estrutura populacional, microevolução no DNA e determinantes de resistência no ambiente hospitalar por meio de epidemiologia molecular, além de propor novas alternativas terapêuticas.

Objetivos Secundários:

- Realizar coletas nas Unidades de Saúde Pública nos estados do Pernambuco;- Realizar o

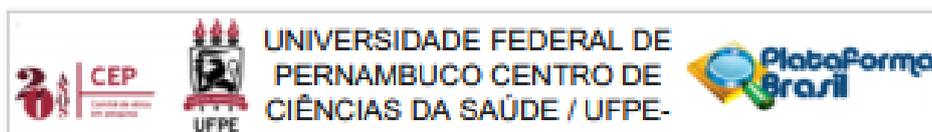
Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde

Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600

UF: PE **Município:** RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepcca@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.415.316

diagnóstico micológico dos isolados coletados no Laboratório de Micologia Médica; - Determinar e comparar a concentração inibitória mínima (CIM) da anfotericina B, fluconazol e das moléculas derivadas do anel aromático de tiofenos, para os isolados do complexo *Cryptococcus neoformans* através do teste de sensibilidade antifúngica descritas pelo protocolos M27-A3 do Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2008); - Determinar a diversidade genética e perfil epidemiológico dos isolados coletados através da identificação molecular MLST e identificação proteômica MALDI-TOF MS.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos, quando houver, serão mínimos, pois a coleta das amostras biológicas será realizada por profissionais qualificados e habilitados. Serão utilizados para o desenvolvimento da referida pesquisa apenas amostras biológicas de pacientes que tiverem solicitação médica para diagnóstico micológico, independente de execução do projeto. Adicionalmente, o pesquisador se compromete com a manipulação do material de forma adequada e segura. Além disto, o pesquisador se compromete com a manipulação adequada e confidencialidade dos dados coletados conforme declaração anexada na plataforma Brasil. O único risco direto será, caso ocorra, constrangimento no momento da solicitação da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). No entanto, será esclarecido ao paciente sobre o direito de não querer participar da pesquisa ou de desistir em qualquer etapa da mesma.

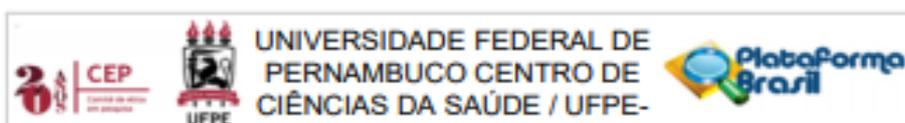
Benefícios:

O trabalho contribuirá com o diagnóstico de confiança, podendo assim traçar um perfil epidemiológico desta micose oportunista que é a criptococose, além da identificação molecular das novas espécies em descoberta, bem como a realização de perfil de sensibilidade, tendo em vista o número limitado dos antifúngicos comercializados, visando assim tratamentos mais eficazes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão incluídos na pesquisa, pacientes com suspeita de criptococose atendidos no Hospital das Clínicas HU/UFPE e Hospital Correia Picango. Não participarão pacientes que não apresentem quadro sugestivo dessa micose. O material biológico será líquido cefalomaquidiano obtido através

Endereço: Av. de Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81) 2122-8588 E-mail: capccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.415.218

de coletas realizadas, por médico, em pacientes com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). O diagnóstico micológico será realizado através do exame direto, isolamento do fungo e identificação proteômica dos agentes etiológicos através da espectrometria de massa por MALDI-TOF MS. Bases moleculares pelo MLST (Multilocus sequence typing) serão utilizadas no estudo epidemiológico. Os testes com antifúngicos e novas substâncias seguirão o protocolo M27-A3 do Clinical and Laboratory Standard Institute. Ainda, os prontuários dos pacientes serão avaliados. Análises estatísticas serão também utilizadas para análises dos dados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados.

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências ou inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

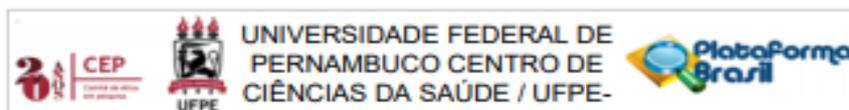
Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do(a) pesquisador(a) assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-6588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



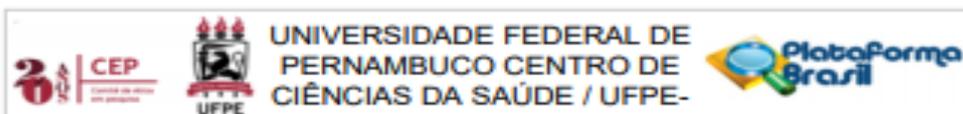
Continuação do Parecer: 2.415.318

ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_P ROJETO_937622.pdf	22/11/2017 09:10:40		Aceito
Outros	CartaRespostaPendencias.docx	22/11/2017 00:09:41	Ertênia Paiva Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investidor	Projeto.docx	20/11/2017 23:14:30	Ertênia Paiva Oliveira	Aceito
Outros	lattesReginaldo.pdf	25/09/2017 22:17:26	Ertênia Paiva Oliveira	Aceito
Outros	lattesErtenia.pdf	25/09/2017 22:16:47	Ertênia Paiva Oliveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	cartadeanuenciaextensao.pdf	25/09/2017 22:06:15	Ertênia Paiva Oliveira	Aceito
Outros	DECLARACAOVINCULO.pdf	25/09/2017 22:05:29	Ertênia Paiva Oliveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	SAME.pdf	25/09/2017 21:53:03	Ertênia Paiva Oliveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CORREAPICANCO.pdf	25/09/2017 21:52:05	Ertênia Paiva Oliveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CETENE.pdf	25/09/2017 21:51:11	Ertênia Paiva Oliveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Micologia.pdf	25/09/2017 21:49:22	Ertênia Paiva Oliveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	INFECTOHC.pdf	25/09/2017 21:48:55	Ertênia Paiva Oliveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	HOSPITALHC.pdf	25/09/2017 21:48:17	Ertênia Paiva Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	termodeconfidencialidade.pdf	25/09/2017 21:47:43	Ertênia Paiva Oliveira	Aceito

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepcca@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.415.216

Ausência	termodeconfidencialidade.pdf	25/09/2017 21:47:43	Ertênia Paiva Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE3.docx	25/09/2017 21:33:39	Ertênia Paiva Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE2.docx	25/09/2017 21:32:47	Ertênia Paiva Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	25/09/2017 21:32:21	Ertênia Paiva Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE.docx	25/09/2017 21:32:02	Ertênia Paiva Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	FOLHADEROSTO.pdf	25/09/2017 21:29:48	Ertênia Paiva Oliveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 05 de Dezembro de 2017

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2125-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br

ANEXO B



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFPE
FILIAL DA EMPRESA BRASILEIRA DE
SERVIÇOS HOSPITALARES



CARTA DE ANUÊNCIA

Declaramos para os devidos fins, que aceitaremos a pesquisadora Ertênia Paiva Oliveira, a desenvolver o seu projeto de pesquisa "**CRYPTOCOCCUS: DETERMINAÇÃO DO PERFIL CLÍNICO-DEMOGRÁFICO DE PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS ATENDIDOS EM UNIDADES DE SAÚDE PÚBLICA DO PERNAMBUCO**", que está sob a coordenação/orientação do Prof. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto. Serão consultados 100 (cem) dos pacientes participantes da pesquisa a ser realizada do segundo semestre de 2017 ao primeiro semestre de 2019 (24 meses).

A aceitação está condicionada a autorização da Gerencia de Ensino e Pesquisa do HC/UFPE, pelo período de execução previsto no referido projeto e ao cumprimento pelo (a)(s) pesquisadores dos requisitos da Resolução 466/12 e suas complementares, comprometendo-se o/a mesmo/a a utilizar os dados pessoais dos sujeitos da pesquisa, exclusivamente para os fins científicos, mantendo o sigilo e garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades.

Antes de iniciar a coleta de dados o/a pesquisador/a deverá apresentar a esta Instituição o Parecer Consubstanciado devidamente aprovado, emitido por Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, credenciado ao Sistema CEP/CONEP.

Recife, em 11 / 09 / 17

Diana Almeida
Assistente Administrativa
HC UFPE SIAPE 1792109

Diana Almeida

Chefe do serviço de arquivo médico e estatística

91 00 09
Prof. Décio Medeiros
Chefe da Unidade de Gerenciamento
da Produção Científica
Hospital das Clínicas - UFPE
Profa. Célia Maria Machado Barboza
Gerente de Ensino, Pesquisa e Extensão do HC/UFPE GEPEX

HC-UFPE Av. Prof. Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária - Recife/PE
CEP: 50670-420 Tel: (81) 2126.3953 / 2126.3984 Fax: 3453.3675
e-mail:hcdiretoria@ufpe.br



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFPE
FILIAL DA EMPRESA BRASILEIRA DE
SERVIÇOS HOSPITALARES

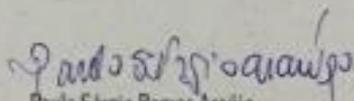
EBSERH

CARTA DE ANUÊNCIA

Declaramos para os devidos fins, que aceitaremos a pesquisadora Erténia Paiva Oliveira, a desenvolver o seu projeto de pesquisa "**CRYPTOCOCCUS: DETERMINAÇÃO DO PERFIL CLÍNICO-DEMOGRÁFICO DE PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS ATENDIDOS EM UNIDADES DE SAÚDE PÚBLICA DO PERNAMBUCO**", que está sob a coordenação/orientação do Prof. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto, e que alojará pacientes da nossa unidade de atendimento ambulatorial e hospitalar. A aceitação está condicionada a autorização da Gerencia de Ensino e Pesquisa do HC/UFPE, pelo período de execução previsto no referido projeto e ao cumprimento pelo (a)(s) pesquisadores dos requisitos da Resolução 466/12 e suas complementares, comprometendo-se o/a mesmo/a a utilizar os dados pessoais dos sujeitos da pesquisa, exclusivamente para os fins científicos, mantendo o sigilo e garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades.

Antes de iniciar a coleta de dados o/a pesquisador/a deverá apresentar a esta Instituição o Parecer Consubstanciado devidamente aprovado, emitido por Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, credenciado ao Sistema CEP/CONEP

Recife, em 24 / julho / 2017


Paulo Sérgio Ramos Araújo
Médico Infectologista
CPAM/HOCRIU

Prof. Dr. Paulo Sérgio Ramos de Araújo
Chefe do serviço da DIP-HC/UFPE



AUTORIZAÇÃO DE USO DE ARQUIVOS/DADOS DE PESQUISA

Declaramos para os devidos fins, que cederemos à pesquisadora **Ertênia Paiva Oliveira**, o acesso aos arquivos de **prontuários** para serem utilizados na pesquisa: **"CRYPTOCOCCUS: DETERMINAÇÃO DO PERFIL CLÍNICO-DEMOGRÁFICO DE PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS ATENDIDOS EM UNIDADES DE SAÚDE PÚBLICA DO PERNAMBUCO"**, que está sob a orientação do Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto.

Esta autorização está condicionada ao cumprimento do (a) pesquisador (a) aos requisitos da Resolução 466/12 e suas complementares, comprometendo-se o(a) mesmo(a) a utilizar os dados pessoais dos sujeitos da pesquisa, exclusivamente para os fins científicos, mantendo o sigilo e garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades.

Antes de iniciar a coleta de dados o/a pesquisador/a deverá apresentar o Parecer Consubstanciado devidamente aprovado, emitido por Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, credenciado ao Sistema CEP/CONEP.

Prof. Décio Medeiros
Chefe da Unidade de Gerenciamento
de Produção Científica
Hospital das Clínicas / EBSERH

Nome/assinatura e carimbo do responsável pela Instituição ou pessoa por ele delegada

ANEXO C



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÃO E COMUNICAÇÕES
CENTRO DE TECNOLOGIAS ESTRATÉGICAS DO NORDESTE

CARTA DE ANUÊNCIA

Ea, André Galembeck, Diretor do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste CETENE/MCTIC-PE, declaro para os devidos fins que estou ciente e de acordo com as atividades do Projeto de Pesquisa Intitulado da pesquisadora Ertênia Paiva Oliveira, a desenvolver o seu projeto de pesquisa "**CRYPTOCOCCUS: DETERMINAÇÃO DO PERFIL CLÍNICO-DEMOGRÁFICO DE PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS ATENDIDOS EM UNIDADES DE SAÚDE PÚBLICA DO PERNAMBUCO**", que está sob a orientação da Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto, cujo objetivo é diagnosticar e caracterizar epidemiologicamente os casos de criptococose em pacientes internados em duas Unidades de Saúde Pública Terciária, identificar a diversidade e estrutura populacional, microevolução no DNA e determinantes de resistência no ambiente hospitalar através de epidemiologia molecular, além de propor novas alternativas terapêuticas. Reiteramos que a etapa de identificação das leveduras de *Cryptococcus* através de MALDI-TOF será a única etapa desenvolvida no CETENE.

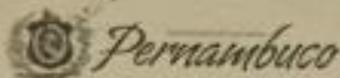
Esta autorização está condicionada ao cumprimento do pesquisador aos requisitos da Resolução 466/12 e suas complementares, comprometendo-se a mesma a utilizar os dados pessoais dos sujeitos da pesquisa, exclusivamente para os fins científicos, mantendo o sigilo e garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades.

Antes de iniciar a coleta de dados a pesquisadora deverá apresentar a esta Instituição o Parecer Consubstanciado devidamente aprovado, emitido por Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, credenciado ao Sistema CEP/CONEP.

André Galembeck
Diretor

Centro de Tecnologias de Estratégicas do Nordeste - CETENE

ANEXO D

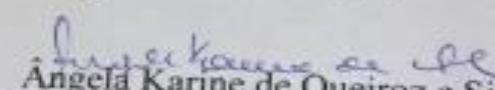
SECRETARIA
DE SAÚDEGOVERNO DO ESTADO DE PERNAMBUCO
SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE PERNAMBUCO
HOSPITAL CORREIA PICANÇO

Recife, 25 de julho de 2017.

CARTA DE ANUÊNCIA

Declaramos que anuímos com a realização da pesquisa intitulada **“CRYPTOCOCCUS: DETERMINAÇÃO DO PERFIL CLÍNICO-DEMOGRÁFICO DE PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS ATENDIDOS EM UNIDADES DE SAÚDE PÚBLICA DO PERNAMBUCO”** sob o orientador Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto, procedente da Universidade Federal de Pernambuco– UFPE, com participação da Aluna Ertênia Paiva Oliveira, com o compromisso dos autores de divulgar o nome do Hospital nos resultados da pesquisa, assim como, fornecer uma cópia do estudo para nossa instituição ao final do mesmo seja na forma de monografias, dissertações, teses artigos publicados, entre outros.

Atenciosamente


Ángela Karine de Queiroz e Silva
Gestora Geral
Hospital Correia Picanço