



PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS



**INVESTIGAÇÃO DA HETERORRESISTÊNCIA AO  
FLUCONAZOL DE ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS  
DO COMPLEXO DE ESPÉCIES *Cryptococcus neoformans* E  
COMPLEXO DE ESPÉCIES *Cryptococcus gattii* DO ESTADO  
DO AMAZONAS**

IZABELA DE MESQUITA BÁRCIA MOREIRA

MANAUS

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

IZABELA DE MESQUITA BÁRCIA MOREIRA

**INVESTIGAÇÃO DA HETERORRESISTÊNCIA AO  
FLUCONAZOL DE ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS  
DO COMPLEXO DE ESPÉCIES *Cryptococcus neoformans* E  
COMPLEXO DE ESPÉCIES *Cryptococcus gattii* DO ESTADO  
DO AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza

MANAUS

2021

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M838i Moreira, Izabela de Mesquita Bácia  
Investigação da heterorresistência ao fluconazol de isolados clínicos e ambientais do Complexo de Espécies *Cryptococcus neoformans* e Complexo de Espécies *Cryptococcus gattii* do Estado do Amazonas / Izabela de Mesquita Bácia Moreira, João Vicente de Souza. 2021  
56 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: João Vicente Braga de Souza  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. Complexo de espécies *Cryptococcus neoformans* . 2. Complexo de espécies *Cryptococcus gattii*. 3. Criptococose. 4. fluconazol. 5. heterorresistência. I. de Souza, João Vicente. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

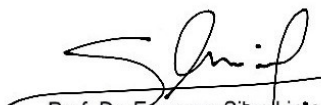
**“Investigação da heterorresistência ao fluconazol de isolados clínicos e ambientais do complexo de espécies *Cryptococcus neoformans* e complexo de espécies *Cryptococcus gattii* do estado do Amazonas”**

**DISCENTE: IZABELA DE MESQUITA BÁRCIA MOREIRA**

PARECER:

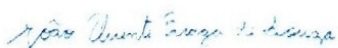
Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 31/03/2021.



Prof. Dr. Emerson Silva Lima  
Coordenador do PPGCF


**A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:**



Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza  
Orientador e Presidente da Banca (UFAM)



Profa. Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem  
Membro (Instituto Adolfo Lutz)



Profa. Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura  
Membro (FIOCRUZ)

*Dedico aos meus pais Maria Célia e Emílio (in memoriam), ao meu esposo Luiz Fernando, ao meu filho Heitor aos meus irmãos Maria Cristina, Antônio Luiz e Emílio Jorge e a toda família e amigos, por toda força e incentivo.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por me abençoar todos os dias, por conceder a graça de realizar o sonho de ingressar no mestrado, por colocar pessoas essenciais nessa caminhada.

A minha mãe pela dedicação familiar, pelos conselhos, por garantir minha formação acadêmica e por sempre me apoiar.

Ao Luiz Fernando pelo apoio incondicional e pelo cuidado e dedicação a nossa família. Ao Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza, por aceitar ser meu orientador e realizar essa tarefa com maestria, paciência, sabedoria, profissionalismo e amizade.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Cortez, por todo incentivo e ensinamento durante esse trabalho, a Sra. foi essencial nessa jornada. A Silvine, por sempre estar disposta a ajudar, ensinar e fazer parte desse trabalho.

Ao Programa de Pesquisa para o SUS (PPSUS) e aos participantes, Dra. Kátia Cruz, Dra. Ani Beatriz Jackisch, Marla e Márcia pelo apoio e parceria.

Aos integrantes da família “Micomaníacos”, Rodrigo Ribeiro, Luciana, Michele, Flávia, Walter, Dra. Érica, Luan, Arine, Kevyn, Juan, Raissa, Lohayna e Naira, pela parceria, dicas, momentos de alegria e apoio.

Aos funcionários do INPA, Maysa, Sr. Francisco, Sr. Raimundo Bezerra, Dona Eliana, Dona Nete, Vanusa, por todo cuidado conosco e auxílio nos ensaios. A Juliana, por toda dedicação e prontidão em disponibilizar as amostras da micoteca do INPA.

Às amigas do PPGCF, Bianca, Karin e Rosa unidas pelas dificuldades e pelo sonho em comum, obrigada pela amizade e apoio.

Ao meu chefe do Laboratório Distrital Leste (LDL), Jander Torres, por sempre me incentivar e ajudar sempre que preciso. A minha parceira de bancada no LDL, Ana Elisa Ponciano, pela parceria e amizade. Ao Rubelmar pelo entusiasmo e disponibilidade em ajudar. A prof<sup>a</sup> Dra. Aya Sadahiro pela prontidão em ajudar, pela generosidade em ensinar e por todo apoio na estatística.

Agradeço a todos que de alguma forma me ajudaram na conclusão desse trabalho.

## RESUMO

A heterorresistência é um fenômeno que tem sido descrito quando se observa uma população aparentemente homogênea apresentar diferentes graus de suscetibilidade a um determinado antifúngico. O objetivo deste estudo foi investigar a heterorresistência ao fluconazol de isolados clínicos e ambientais do complexo de espécies *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* do Estado do Amazonas/Brasil. Foram analisados 45 isolados e 09 cepas padrão. Os isolados clínicos foram provenientes da Fundação de Medicina Tropical Dr Heitor Vieira dourado (FMT-HVD), obtidos entre os anos de 2017 à 2019. Os isolados de origem ambiental pertencem a coleção de fungos de interesse médico do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia que foram isolados de amostras da cidade de Manaus/Amazonas/Brasil. Os testes realizados foram a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), teste de determinação do nível de heterorresistência ao fluconazol (NHF), teste de adaptação à níveis de FCL acima de NHF (ADP) e o teste de estabilidade de heterorresistência. Os isolados clínicos do complexo de espécies do *Cryptococcus gattii* apresentaram CIM superior aos isolados ambientais. Todos os isolados clínicos e ambientais demonstraram heterorresistência ao fluconazol e significativa parte apresentou valores de NHF superior a 16 µg/mL, esse *breakpoint* é considerado relevante e foi adotado neste estudo. No experimento de adaptação, significativa parte dos isolados foram capazes de apresentar crescimento em concentrações de fluconazol ainda maior que o NHF. Após nove repiques em meios de cultivo sem fluconazol, os fungos submetidos ao experimento de adaptação tiveram seu NHF reduzido, no entanto, no período, nenhum NHF retornou ao valor do NHF original. Os experimentos demonstraram que, em média, o valor do NHF dos isolados foi 15,9 vezes maior que a CIM original. Os experimentos demonstraram ainda que após o experimento de adaptação o valor do NHF foi 59,3 vezes maior que o valor da CIM original. Portanto, a maior parte dos isolados apresentaram valores de NHF muito superiores a 16 µg/mL. Esses resultados colocam em discussão a relevância clínica do ensaio de CIM e motivam o desenvolvimento de estudos *in vivo* para medir o impacto da heterorresistência no curso da criptococose.

**Palavras-chave:** Complexo de espécies *Cryptococcus neoformans*, Complexo de espécies *Cryptococcus gatti*, Criptococose, fluconazol, heterorresistência.

## ABSTRACT

Heteroresistance is a phenomenon that has been described when an apparently homogeneous population has different degrees of susceptibility to a particular antifungal. The aim of this study was to investigate the heteroresistance to fluconazole of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* / *Cryptococcus gattii* species complex in the State of Amazonas/Brazil. Were analyzed 45 isolates and 09 standard strains. The clinical isolates came from the Dr Heitor Vieira Dourado Tropical Medicine Foundation (FMT-HVD), obtained between the years 2017 to 2019. The isolates of environmental origin belong to the collection of fungi of medical interest of the National Research Institute of the Amazon that were isolated from samples in the city of Manaus/Amazonas/Brazil. The tests performed were the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC), test to determine the level of resistance to fluconazole (LHF), test of adaptation to FCL levels above NHF (ADP) and the heteroresistance stability test. The clinical isolates of the *Cryptococcus gattii* complex showed MIC higher than the environmental isolates. All clinical and environmental isolates showed heteroresistance to fluconazole and a significant part presented NHF values above 16 µg / mL. In the adaptation experiment, a significant part of the isolates were able to show growth in concentrations of fluconazole even higher than NHF. After nine replications in culture media without fluconazole, the isolate submitted to the adaptation experiment had their NHF reduced, however, in the period, no NHF returned to the original NHF value. The experiments showed that, on average, the NHF value of the isolates was 15,9 times greater than the original MIC. The experiments also demonstrated that after the adaptation experiment, the NHF value was 59,3 times greater than the original MIC value. Therefore, most of the isolates had NHF values well above 16 µg / mL. These results call into question the clinical relevance of the MIC test and motivate the development of in vivo studies to measure the impact of heteroresistance in the course of cryptococcosis.

**Keywords:** Species complex *Cryptococcus neoformans*, Species complex *Cryptococcus gattii*, cryptococcosis, fluconazole, heteroresistance.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1**-Fluxograma das atividades realizadas no presente trabalho. ....21
- Figura 2**-Esquema de preparação da microplaca para o teste de microdiluição.....24
- Figura 3**-Esquema utilizado no presente trabalho para a realização do teste de nível de heterorresistência ao fluconazol (NHF).....25
- Figura 4**-Esquema utilizado no presente trabalho para a realização do teste de adaptação a níveis superiores ao NHF.....26
- Figura 5**-Esquema do teste de estabilidade da heterorresistência ao fluconazol .....27
- Figura 6**-Violin-Plot: valores da concentração inibitória mínima (CIM em  $\mu\text{g/mL}$ ) determinada pelo método de microdiluição dos isolados clínicos e ambientais do Norte do Brasil do complexo de espécies de *C.neoformans* /*C. gattii* frente ao fluconazol transformados em Logaritmo Natural (LN) a partir do Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....34
- Figura 7**-Violin- Plot: Valor do nível de heterorresistência ao fluconazol (NHF em  $\mu\text{g/mL}$ ) dos isolados do Norte do Brasil, clínicos e ambientais do complexo de espécies de *Cryptococcus* spp. transformados em Logaritmo Natural (LN). ....37
- Figura 8**-Violin-Plot: Comparação dos valores da concentração inibitória mínima (CIM em  $\mu\text{g/mL}$ ) e nível de heterorresistência ao fluconazol (NHF em  $\mu\text{g/mL}$ ) dos isolados do Norte do Brasil, clínica e ambiental do complexo de espécies de *C.neoformans*/*C. gattii*, analisados em dois grupos, com os valores transformados em Logaritmo Natural e analisados pelo teste paramétrico, Teste tstudent ( $p < 0,05$ ) .....38
- Figura 9**- Violin- Plot: Valor da adaptação superior ao nível de heterorresistência ao fluconazol ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos isolados clínicos e ambientais do complexo de espécies de *C.neoformans*/*C. gattii* transformados em Logaritmo Natural (LN) .....41
- Figura 10**- Violin-Plot:Comparação entre os valores da concentração inibitória mínima (CIM em  $\mu\text{g/mL}$ ), nível de heterorresistência (NHF em  $\mu\text{g/mL}$ ) e adaptação à níveis superiores ao NHF (ADP em  $\mu\text{g/mL}$ ), dos isolados do Norte do Brasil, do complexo de espécies de *C.neoformans*/*C. gattii*, clínico e ambiental comparados por teste não paramétrico, Teste Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ), com os dados transformados para Logaritmo Natural. ....43

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Classificações das espécies de *Cryptococcus spp*..... 11
- Tabela 2-**Lista das cepas padrão que foram utilizadas no estudo, contendo algumas informações como tipo molecular (TM) e mating type (MAT)..... 22
- Tabela 3-**Valor da média aritmética, desvio padrão e valores mínimo e máximo da concentração inibitória mínima (CIM em µg/mL), determinados pelo método de microdiluição dos isolados do Norte do país, clínicos e ambientais do complexo de espécies de *C.neoformans* /*C. gattii* frente ao fluconazol. .... 33
- Tabela 4-**Valores da concentração inibitória mínima (µg/ml), do nível de heterorresistência ao fluconazol (µg/ml) e frequência de heterorresistência (%) de todos os isolados ambientais e clínicos e cepas de referência do complexo de espécies de *C.neoformans* /*C. gattii* ..... 35
- Tabela 5-** Valor da média aritmética, desvio padrão e valores mínimo e máximo do nível de heterorresistência ao fluconazol (NHF em µg/mL), dos isolados do Norte do país, clínicos e ambientais do complexo de espécies de *C.neoformans* /*C. gattii* frente ao fluconazol..... 37
- Tabela 6-** Valores do nível de adaptação máxima ao fluconazol (µg/mL), número de repiques, NHF após os repiques em meio de cultura sem fluconazol dos isolados do Norte do Brasil, clínico e ambientais e das cepas de referência do complexo de espécies de *C.neoformans* /*C. gattii*..... 39
- Tabela 7-** Valor da média aritmética, desvio padrão e valores mínimo e máximo dos valores da adaptação acima do nível de heterorresistência ao fluconazol (µg/mL) dos isolados do Norte do Brasil, clínicos e ambientais, do complexo de espécies de *C.gattii*/*C.neoformans* frente ao fluconazol. .... 41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg/mL - Microgramas por mililitro

µL - Microlitro

ADP- Teste de Adaptação

AFLP - análise de polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado

AFST-EUCAST - *Antifungal susceptibility testing – Europe Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

AMBD- anfotericina B desoxicolato

AMBL - anfotericina B lipossomal

ATCC -*American Type Culture Collection*

BaCl<sub>2</sub> - Cloreto de bário

CFP - Coleção de Fungos Patogênicos

CIM - Concentração inibitória mínima

CLSI -*Clinical and Laboratory Standards Institute*

CGA- *Cryptococcus gatti* ambiental

CGC - *Cryptococcus gatti* clínico

CNA - *Cryptococcus neoformans* ambiental

CNC - *Cryptococcus neoformans* clínico

CrAg- Antígeno criptocócico

CrAg LFA- antígeno criptocócico Lateral Flow Assay

Crh1- Cromossomo 1

Crh4- Cromossomo 4

EFA- *Early fungicidal activity*, atividade fúngica precoce

FCL - Fluconazol

IDSA - Sociedade de doenças infecciosas da América

IFD - Doenças fúngicas invasivas

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INPA - Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia

IPEC/FIOCRUZ - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz

LBA- Lavado brônquico alveolar

LCR - Líquido cefalorraquidiano

MAT-*Matingtypes*, tipos de acasalamento

MLST- Multilocus gene sequencetyping

MOPS - Ácido 3[N-morfolino] propoanossulfônico

NaCl -Cloreto de sódio

NCCLS- *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

NHF - Nível de heterorresistência ao fluconazol

NIH - *National Institutes of Health*

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCR -*Polymerasechainreaction*, reação em cadeia da polimerase

PIC- Pressão intracraniana

PPSUS - Programa de Pesquisa para o SUS

RFLP -*Restrictionfragmentlengthpolymorphisms*, Fragmentos de DNA gerados por enzima de restrição

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*(meio quimicamente definido composto por aminoácidos e vitaminas)

SIRI C - Síndrome inflamatória da reconstituição imunológica criptocócica

SNC - Sistema nervoso central

spp- Espécies

TARV – Terapia antiretroviral

TM - Tipo molecular

TNF - Fator de necrose tumoral

UFC/mL- Unidades formadoras de colônias por mililitro

URA5 - Gene da enzima Orotidina Monofosfato Pirofosforilase

WBC- *White blood cells*, células brancas do sangue

YPD- *Yeast peptone dextrose*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>10</b>
A Criptococose.....	10
Taxonomia do <i>Cryptococcus</i> spp. ....	10
Epidemiologia da criptococose e a distribuição do complexo de espécies do <i>C. neoformans</i> e complexo de espécies do <i>C. gattii</i> .....	11
Agentes etiológicos .....	12
A infecção e manifestações clínicas .....	13
Diagnóstico.....	14
Tratamento .....	15
Resistência .....	17
Heterorresistência .....	18
Métodos para avaliação de heterorresistência .....	19
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
Objetivo geral.....	20
Objetivos específicos .....	20
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
Fluxograma de atividade.....	21
Cepas de referência .....	21
Isolados clínicos e ambientais.....	22
Determinação da Concentração Inibitória Mínima .....	23
Procedimentos para o teste de heterorresistência .....	24
Avaliação do nível de heterorresistência ao FLC .....	24
Teste de adaptação a níveis de fluconazol superiores ao NHF .....	25
Teste de estabilidade da heterorresistência ao fluconazol .....	26
Análise estatística.....	27
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
<b>2 Materiais e métodos.....</b>	<b>30</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>49</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A criptococose é uma infecção fúngica causada pelo complexo de espécies *Cryptococcus neoformans* e pelo complexo de espécies *Cryptococcus gattii* (KWON-CHUNG et al., 2017). A meningite criptocócica é a principal manifestação da doença. Possui ocorrência estimada de 223.100 casos/ano em todo o mundo e resulta em aproximadamente 181.100 mortes/ano (RAJASINGHAM et al., 2017). Doença negligenciada que ocorre em indivíduos com imunossupressão ocasionada pela AIDS, outras condições médicas e em indivíduos aparentemente imunocompetentes (NYAZIKA et al., 2018).

Na terapia antifúngica das formas graves, incluindo-se a neurocriptococose, existem as fases de indução, com anfotericina-B e fase de consolidação e de supressão com o fluconazol (FCL) ou itraconazol (PERFECT et al., 2010). Estudos indicam que a resistência do *C. neoformans* aos azóis ocorre devido a alterações genéticas por meio de mutações ou superexpressão gênica e ainda a um fenótipo ligado à heterorresistência (GULLO, 2013). A heterorresistência tem sido definida como um fenômeno no qual uma população de leveduras aparentemente homogênea apresenta diferentes graus de susceptibilidade a um determinado antifúngico, ou seja, existem leveduras resistentes a altas doses de antifúngico dentro de uma população classificada como sensível.

É provável que este mecanismo contribua para o fracasso da terapia de FLC para criptococose (SIONOV, 2010). Recentemente, trabalhos têm sido realizados com a finalidade de investigar a heterorresistência em isolados dos complexos patogênicos de *Cryptococcus* spp. Em 2013, Sionov et al. demonstraram o surgimento de clones resistentes em cérebro de ratos, durante o tratamento com FCL. Ferreira et al. (2015), avaliaram as alterações morfológicas e aumento da virulência do *Cryptococcus gattii*. Recentemente, Feliciano et al. (2017) investigaram o nível de heterorresistência ao FCL em cem amostras clínicas e ambientais em cepas de *Cryptococcus* na Região Sudeste do Brasil.

Apesar dos esforços regionais para investigar os agentes causadores da criptococose no estado do Amazonas, poucos estudos avaliaram a sensibilidade dos isolados regionais a antifúngicos. Quanto à heterorresistência, nenhum estudo regional foi conduzido. O presente trabalho obteve resultados para enriquecer a discussão sobre heterorresistência ao FCL de isolados clínicos e ambientais do Norte do país e tem como beneficiados principais os pacientes acometidos pela criptococose.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### A Criptococose

A criptococose é uma doença fúngica, emergente, de distribuição mundial causada pelo complexo de espécies *Cryptococcus neoformans* e complexo de espécies *Cryptococcus gattii* (KWON-CHUNG et al.,2017).

Taxonomia do *Cryptococcus* spp.

A taxonomia do *Cryptococcus* spp.passa por frequentes revisões desde os primeiros isolados.Inicialmente a classificação ocorria de acordo com reações imunológicas de seus polissacarídeos capsulares. As cepas com sorotipo A e D e o híbrido AD eram pertencentes ao *C. neoformans*, enquanto as cepas com o sorotipo B e C eram classificadas como *C. gattii*. A partir de 1990, as cepas do sorotipo A foram chamadas de *C.neoformans* var. *grubbi* e as cepas do sorotipo D de *C.neoformans* var. *neoformans*,baseado em diferenças genotípicas e fenotípicas (FRANZOT; SALKIN; CASADEVALL, 1999).

Com estudos de base filogenética em reação de PCR-RFLP do gene da enzimaorotidina monofosfato pirofosforilase (URA5), Meyer em 2003,propôs a divisãodos isolados em oito tipos moleculares principais:VNI , VNII, VNIIIeVNIV para *Cryptococcus neoformans* e VGI, VGII, VGIII e VGIV para *Cryptococcus gattii* (MEYER et al., 2003). Com a técnica de tipagem molecular AFLP classificou se *C. neoformans* em: AFLP1 (VNI), AFLP1A / IB (VNII), AFLP3 (VNIII) e AFLP2 (VNIV) e *C. gattii* foi classificado em: AFLP4 (VGI), AFLP6 (VGII) , AFLP5 (VGIII) e AFLP6 (VGIV), conforme pode se visualizar na Tabela 1 (MEYER et al., 2009).Em 2015, Hagen et al. propuseram uma nova nomenclatura dividindo os agentes da criptococose em sete novas espécies:*C. neoformans* (VNI e VNII), *C. deneoformans* (VNIV), *C. gattii* (VGI), *C. bacillisporus* (VGIII), *C. deuterogattii* (VGII), *C. tetragattii* (VGIV) e *C. decagattii* (VGIV) (HAGEN et al., 2015). Segundo Kwon-Chung et al.(2017), a mudança merece mais estudos e discussão antes da adoção dessa nova nomenclatura. O proposto por estes autores seria usar o termo “Complexo de espécies”, assim acomodaria as espécies já conhecidas e outras futuras descobertas. Nesse estudo adotamos a nomenclatura de Meyer et al. (2003) e Kwon Chung et al.(2017).

Espécies	AFLP		RFLP		
	Franzot; Salkin; Casadevall, (1999)	Meyer et al. (2003)	Meyer et al. (2003)	Hagen et al. (2015)	Kwon Chung et al.(2017)
	AFLP1	VNI	<i>C. neoformans</i>		
<i>Cryptococcus neoformans var. grubii</i>	AFLP1A/ VNB	VNII	<i>C. neoformans</i>		
<i>Cryptococcus neoformans var. neoformans</i>	AFLP1B	VNII			Complexo de espécies <i>Cryptococcus neoformans</i>
	AFLP2	VNIV	<i>C. deneofomans</i>		
<i>Cryptococcus neoformans híbrido</i>	AFLP3	VNIII	<i>C. deneofomans</i> híbrido		
	AFLP4	VGI	<i>C. gattii</i>		
	AFLP5	VGIII	<i>C. bacillisporus</i>		
<i>Cryptococcus gattii</i>	AFLP6	VGII	<i>C. deuterogattii</i>		Complexo de espécies <i>Cryptococcus gattii</i>
	AFLP7	VGIV	<i>C. tetragattii</i> <i>C. decagattii</i>		

**Tabela 1-** Classificações das espécies de *Cryptococcus*.

FONTE: Franzot; Salkin; Casadevall (1999); Meyer et al. (2003); Kwon Chung et al. (2017) e Hagen et al. (2015).

Epidemiologia da criptococose e a distribuição do complexo de espécies do *C. neoformans* e complexo de espécies do *C. gattii*.

Em 2017, Rajasingham et al. detectaram 278.000 pessoas positivas para o antígeno criptocócico no mundo. As mortes globais anuais por meningite criptocócica foram estimadas em 181.100, com 135.900 mortes na África Subsaariana. A meningite criptocócica foi



responsável por 15% das mortes relacionadas à AIDS. Segundo Firacative (2018), na América Latina, mais de 5.000 indivíduos são afetados a cada ano com meningite criptocócica, causando 2.400 mortes anuais. No Brasil, em um estudo de 2000 a 2012, foi observada a taxa de mortalidade média de 2,41/milhão de habitantes, segundo Soares (2015). No Amazonas, na FMT-HVD, a criptococose foi a sexta causa de óbito em pacientes soropositivos que passaram por necropsia no período de 1996 a 2003, segundo Souza et al. (2008).

Em relação à distribuição dos agentes etiológicos, o *C. neoformans* (VNI, VNII, VNIII) é encontrado em todo o mundo, enquanto o *C. neoformans* (VNIV) é observado em países europeus. O complexo de espécies *C. gattii* tem sido observado em regiões tropicais e subtropicais. Recentemente, o *C. gattii* foi identificado em climas temperados como a Ilha de Vancouver e a região Noroeste dos Estados Unidos (KIDD et al., 2004). Segundo Firacative et al. (2018), em um estudo molecular de 3.486 isolados na América Latina foram encontrados 72,8% de *C. neoformans* VNI (AFLP1) e 14,4% de *C. gattii*, VGII (AFLP6), corroborando dados globais. Essa distribuição pode ser influenciada pela alta prevalência de *C. gattii* no Brasil. No Amazonas, no estudo de Freire, et al. (2012), 29,8% foram identificados como *C. gattii*, do total de 57 isolados. Além dessa ampla distribuição ambiental, o complexo de espécies de *Cryptococcus* apresenta uma variedade de formas, sendo a leveduriforme a forma mais comum nas infecções (GH; DAVIDSON; HEITMAN, 2004).

### Agentes etiológicos

O complexo de espécies *C. neoformans* e o complexo de espécies *C. gattii* é composto por leveduras encapsuladas ovaladas ou globosas, com brotamento único ou múltiplo de base estreita. As colônias apresentam-se brancas a creme, em meio de cultivo como ágar Sabouraud e ágar de levedura peptonada e dextrose (YPD), à temperatura de 25 a 37°C após 72 horas (KON et al., 2008).

O ciclo de vida do complexo de espécies de *Cryptococcus* envolve tanto formas assexuadas quanto sexuadas. A forma assexuada se reproduz por mitose com brotamento de base estreita, essa é a levedura haplóide encapsulada encontrada em espécime clínica e ambiental. Já a forma sexuada é obtida em laboratório, sob certas condições, resultado do acoplamento bipolar de dois alelos alternativos, MAT $\alpha$  e MAT $\alpha$ , produzindo basídio e basidiósporo (MAZIARZ; PERFECT, 2016). Foi observado que a levedura haplóide ou basidiósporo pode sobreviver em meio intracelular sem ser destruído por fagocitose (TUCKER; CASADEVALL, 2002).

O complexo de espécies de *Cryptococcus* possui vários mecanismos de sobrevivência e replicação no hospedeiro, como desenvolvimento dentro de macrófagos, formação da cápsula polissacarídica que o protege de condições adversas, os mecanismos antifagocitários, produção de melanina, enzimas degradativas e a capacidade de viver em temperaturas fisiológicas, são exemplos desses mecanismos. (GOVENDER, 2016). O processo de formação de célula fúngica aumentada é chamado de titanização. A célula aumentada, chamada de célula titã, possui diâmetro maior que 10 µm até 100µm, com parede celular espessa, cápsula mais densa e maior conteúdo de DNA. São células altamente poliplóides e produzem células filhas haplóides. Essas alterações dificultam a fagocitose pelos macrófagos e aumentam a virulência da cepa (MUKAREMERA et al., 2018). Estudos de Dambuza et al.(2018), demonstraram que estímulos do hospedeiro como a presença do soro e o fluido bronco-alveolar são relevantes no processo de titanização. Os fatores de virulência do agente, o estado imunológico do paciente assim como o tratamento são fatores decisivos no desenvolvimento da infecção.

#### A infecção e manifestações clínicas

A criptococose conhecida a princípio como doença de Busse-Buschke, torulose e blastomicoseeuropéia ocorre devido a inalação de propágulos contaminantes (esporos ou leveduras dessecadas). Após a inalação, os macrófagos alveolares fagocitam o fungo. As células T auxiliares produzem citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF), interferon-γ e interleucina-2, resultando em inflamação granulomatosa (PERFECT, 2005).

O estado imunológico do paciente determina a instalação e disseminação da doença. Nos imunocomprometidos, a meningoencefalite é a forma mais comum da doença. Nesses pacientes, o envolvimento pulmonar varia de 10 a 55%, embora os sintomas do SNC predominem na maioria das vezes (BRIZENDINE; BADDLEY; PAPPAS, 2011). Sintomas como dores de cabeça, rigidez na nuca e vômitos são relatados na meningite criptocócica(MPOZA; RHEIN; ABASSI, 2018).

Apesar da grande predileção do complexo de espécies de *Cryptococcus* spp. pelo SNC e pulmões, outros locais de infecção menos frequentes como pele, próstata e olhos são afetados. Nos pacientes gravemente imunossuprimidos o *C. neoformans* pode infectar qualquer órgão do corpo (PERFECT; CASADEVALL, 2002). As manifestações cutâneas ocorrem em 10% dos pacientes, com lesões de pele tipo molusco e o envolvimento ósseo ocorre em 5% dos casos (WARKENTIEN; CRUM-CIANFLONE, 2010). A criptococose acomete mais frequentemente paciente HIV soropositivos, atingindo também pacientes “aparentemente imunocompetentes”. O

complexo de espécies *C. neoformans* é a causa mais comum de meningite entre adultos soropositivos para o HIV na África Austral e Oriental (JARVIS et al., 2010). Em pacientes considerados imunocompetentes, o complexo de espécies *C. gattii* é o principal causador da doença (PAPPAS et., 2001). Com o advento da terapia antirretroviral, nos países desenvolvidos, houve uma diminuição da incidência da criptococose associada ao HIV. Por outro lado, a incidência da doença associada a fatores de risco como transplantes de órgãos, terapias imunossupressoras, neoplasias e processos linfoproliferativos não foi alterado (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

Em relação a fatores relacionados ao paciente, em um estudo na França, Dromer et al. (2007), observaram maior gravidade da criptococose em pacientes do sexo masculino e HIV positivos. Em 2012, Freire et al. no Amazonas, também obtiveram resultados semelhantes, onde pacientes do sexo masculino, na idade de 16-30 anos e HIV positivo (70%) foram mais afetados pela criptococose.

### Diagnóstico

A levedura do complexo de espécie de *Cryptococcus* pode ser observada numa variedade de amostras clínicas por exames diretos e sorológicos como urina, escarro, lavado brônquico, líquido, lesões de pele, pus de abscesso, biópsia, aspirado de gânglios (KON et al., 2008). Pode se utilizar a microscopia, a cultura ou a detecção de antígenos nessas amostras para o diagnóstico de criptococose. Na microscopia, utiliza-se a tinta nanquim com baixa sensibilidade, se a carga fúngica for baixa. A cápsula fúngica repele a tinta e pode ser identificada por um halo branco em torno da cápsula. A cultura é considerada o teste “padrão ouro” no diagnóstico da criptococose, mas necessita de tempo para o crescimento fúngico, geralmente mais de sete dias e pessoal especializado para execução da técnica (MARCOS; PINCUS, 2013). A detecção do antígeno criptocócico pode ser realizada por aglutinação de látex, imunoensaio enzimático e recentemente, por ensaio imuno-cromatográfico, o Lateral Flow Assay (CrAg LFA), com maior sensibilidade em relação aos outros testes (ABASSI; BOULWARE; RHEIN, 2015).

No manejo de suspeitas de meningite são feitas punções lombares (LP) para diminuição da pressão intracraniana e análise do LCR, contagem de glóbulos brancos (WBC) por  $\mu\text{L}$ , detecção da presença de CrAg e realização da cultura da amostra (UFC/mL). A esterilização do LCR é almejada após a fase de indução (MPOZA; RHEIN; ABASSI, 2018).

## Tratamento

A Sociedade de Doenças Infecciosas da América (IDSA) publicou em 2000 e foi atualizado em 2010, as “Diretrizes Práticas para o Tratamento da Doença Criptocócica”. O tratamento da meningite criptocócica é dividido em três fases: indução, consolidação e manutenção. Na fase de indução, o tratamento de primeira linha para meningite criptocócica é a anfotericina B (0,7 a 1,0 mg/kg/dia) e flucitosina (100 mg/kg/dia), por via intravenosa por duas semanas. O custo da flucitosina e o não licenciamento em alguns países, como no Brasil, é um fator limitante desse tratamento, como alternativa usa-se anfotericina B e fluconazol (>800mg/dia). Já na fase de consolidação usa-se o fluconazol (400 a 800 mg/dia) por pelo menos oito semanas e na manutenção, fluconazol 200 mg/dia, por 6 a 12 meses ou até a melhora imunológica (PERFECT et al., 2010).

Devido ao fato da anfotericina B ter efeitos colaterais como anemia, flebite, insuficiência renal, hipomagnesemia, hipocalcemia e necessitar de internação hospitalar para a administração, estudos estão sendo realizados em países em desenvolvimento para diminuir a dosagem da anfotericina B e aumentar a dosagem do fluconazol. Além de ser uma recomendação das diretrizes da IDSA e da OMS, caso a anfotericina B e a flucitosina não estejam disponíveis deve se optar por altas doses de fluconazol (ABASSI; BOULWARE; RHEIN, 2015). Apesar de estudos comprovarem que a associação do fluconazol com a anfotericina B diminui a mortalidade, diminui a resistência ao triazol e melhora a depuração fúngica (SMITH et al., 2015). Na prevenção, a OMS preconiza a terapêutica antifúngica, também com o uso do fluconazol para adultos infectados pelo HIV, com células CD4 menor que 100 céls/ $\mu$ L, onde a prevalência de CrAg (antígeno criptocócico) seja maior ou igual a 3 % (SAWADOGO et al., 2016).

A fase de indução tem se como objetivo obter uma rápida esterilização do LCR, com isso mede-se a EFA, a atividade fungicida precoce (ABASSI; BOULWARE; RHEIN, 2015). A anfotericina B lipossomal (AMBL) é mais eficiente e menos tóxica que a anfotericina B desoxicolato (AMBD), segundo Graybill et al.(1982), devido ao fato da anfotericina chegar às células reticuloendoteliais onde se encontram os patógenos intracelulares. A anfotericina é um polieno e tem ação fungicida, formando poros na membrana celular pela ligação ao ergosterol da parede celular criptocócica, causando assim morte celular. Já o fluconazol é um azol de ação fungistática, inibe a 14 $\alpha$  desmetilase, enzima necessária para a conversão do lanosterol em ergosterol, composto fundamental na formação da parede fúngica (MAY et al., 2015).

Novos medicamentos estão sendo estudados, como o isavuconazol, um triazol, oral e intravenoso, na forma de pró fármaco usado para doenças fúngicas invasivas (IFD) (THOMPSON et al., 2016). Outro exemplo é o voriconazol, um triazol de amplo espectro, com excelente atividade contra o complexo de espécies de *C. neoformans* boa penetração na barreira hematoencefálica (YAO et al., 2015). A sertralina, um antidepressivo que também tem capacidade de inibir a tradução de proteínas no complexo de espécies de *C. neoformans* também está sendo estudado como mais uma opção no tratamento da criptococose (SMITH et al., 2015). O uso de nanopartículas de peptídeos antimicrobianos auto organizados também estão sendo testados em infecções causadas pelo complexo de espécies de *C. neoformans* com resultados promissores semelhantes a Anfotericina B, mas são necessários mais estudos sobre novas drogas (WANG et al., 2010).

Além da correta escolha do tratamento terapêutico, na meningite criptocócica deve se ter o manejo adequado da pressão intracraniana (PIC). Esta pressão elevada é indicador prognóstico associado com maior carga fúngica no SNC e deve se ter punções diárias se a pressão for superior a 25 mmHg (WARKENTIEN; CRUM-CIANFLONE, 2010).

Uma problemática em relação ao tratamento de pacientes portadores do vírus da imunodeficiência adquirida é que em 45% dos casos em tratamento antirretroviral (TARV) associada à criptococose, pode ocorrer a síndrome inflamatória da reconstituição imunológica criptocócica (SIRI-C). Esta seria uma resposta inflamatória exacerbada ao complexo de espécies de *Cryptococcus* spp. devido à restauração parcial do sistema imune (NADAL; MANZIONE, 2009). Ocorrendo sintomas meníngeos e elevação da PIC. É necessário diferenciar se os sintomas do SNC é da SIRI-C, progressão da doença ou recaídas (WARKENTIEN; CRUM-CIANFLONE, 2010). A recaída da meningite criptocócica ocorre com sintomas meníngeos, assim como a SIRI-C, mas se difere desta na cultura do LCR, onde a cultura dos casos de recaída se recupera o fungo e na SIRI C a cultura é considerada estéril (ABASSI; BOULWARE; RHEIN, 2015). A SIRI-C também pode ocorrer em 4,8% dos pacientes transplantados de órgãos sólidos (HADDOW, 2010).

## Resistência

A resistência aos antibióticos é uma preocupação crescente na cura de doenças infecciosas e na criptococose tem se a mesma preocupação. A causa da resistência ao fluconazol ainda não é um fato elucidado, estudos apontam uma dissomia cromossômica principalmente no cromossomo 1 (Chr1), o qual é o primeiro a ser duplicado como forma de adaptação ao aumento crescente na concentração do azol (SIONOV; CHANG; KWON-CHUNG, 2013). No Chr 1 estão localizados dois importantes genes relacionados a resistência aos azóis, são o ERG 11 e o AFR1. A duplicação cromossômica resulta na superexpressão destes genes. O gene ERG11 codifica a enzima alvo do fluconazol, a lanosterol 14 $\alpha$  desmetilase. Já o gene AFR1 codifica o transportador de cassete de ligação de ATP da bomba de efluxo de azóis (MAY et al.,2015).

Estudos de Sanguinetti et al. (2006) indicaram que a regulação positiva de AFR1 é um determinante importante do aumento da resistência *in vitro* de *C. neoformans* a azóis. Chang et al. (2018) estudaram as bombas de efluxo, AFR1, AFR2, MDR1, nos complexos de espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, onde concluíram que a AFR1 é o principal responsável pelo efluxo de triazóis em ambas espécies.

Outros fatores foram relacionados à resistência, Alspaugh (2015) associou fenótipos como produção de cápsula, produção de melanina, secreção de proteínas e capacidade termotolerante a 37°C com a virulência do complexo de espécies de *Cryptococcus* spp. Rossi et al. (2016), observaram que a resistência ao fluconazol pode alterar a morfologia dos isolados. O mesmo ocorre em bactérias, no mecanismo da resistência aos antimicrobianos, onde o preço da adaptação é a redução do crescimento bacteriano (ANDERSSON; HUGHES, 2010).

Para analisar a sensibilidade dos microrganismos frente às drogas utiliza-se o teste padronizado de Microdiluição em Caldo, segundo a Norma M27 A4 do CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute). A concentração inibitória mínima (CIM) do fluconazol é a concentração da droga onde ocorre redução de 50% ou mais do crescimento fúngico em comparação ao controle positivo (REX et al., 2008). Os valores de corte para o complexo de espécies de *Cryptococcus* spp. ainda não foram estabelecidos, mas alguns estudos extrapolam valores já estipulados para *Candida* spp. segundo Perfect e Cox (1999) e Aller et al. (2000) valores  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$  são considerados um valor relevante. Mpoza; Rhein; Abassi, (2018), reforçam uma importante questão sobre a necessidade de realizar um teste inicial de sensibilidade aos antifúngicos para diferenciar se a resistência à droga foi adquirida ou intrínseca. Apesar de estudo observar que os resultados obtidos com vários métodos de teste de

susceptibilidade antifúngica não correlacionaram com o resultado clínico precoce em pacientes com criptococose (DANNAOUI et al., 2006).

## Heterorresistência

Heterorresistência é a resistência a antifúngico específico expresso por um subconjunto de população de microrganismos que geralmente é suscetível com base nos pontos de interrupção do tradicional teste de suscetibilidade *in vitro*. Ocorre a seleção da subpopulação exposta a antifúngicos que é capaz de expressar, de forma reversível, mecanismos relacionados à resistência aos medicamentos. Esta resposta é abolida quando a droga é removida. (FERREIRA; SANTOS, 2017). Diferente da resistência onde ocorre a seleção de microrganismos que sofreram mutação de forma espontânea e irreversível (BRAUNER et al., 2016).

Desde 1947, a heterorresistência vem sendo observada em bactérias gram-positivas e gram-negativas (EL-HALFAWY; VALVANO, 2015). Mondon et al. (1999) descreveram pela primeira vez o processo de heterorresistência em isolados do complexo de espécies de *C. neoformans* frente ao fluconazol. Esse fenômeno pode estar muito relacionado com a falha terapêutica antifúngica, já que se observa maior resistência à droga em isolados recuperados de casos clínicos em que a doença é recorrente. Estudos são necessários para entender os mecanismos da adaptação fúngica e quais fatores podem interferir nesse processo. Em 2013, Sionov; Chang e Kwon- Chung observaram subclones resistentes a drogas isolados de cérebro de camundongos submetidos a longo tratamento com fluconazol que após a passagem em meio sem fluconazol, perdiam a dissomia e a CIM inicial era restabelecida. Sykes et al.(2017), relataram pela primeira vez, um caso de *C gattii* (VGIII) o qual desenvolveu heterorresistência *in vivo*, durante tratamento antifúngico, onde ocorreu superexpressão de ERG11, a qual reverteu após passagem em meio livre de droga. Mpoza; Rhein; Abassi, (2018), relacionam a recaída da doença clínica com o fato da alteração na taxa de crescimento dos isolados resistentes, onde durante o tratamento os isolados susceptíveis são mortos pelo antifúngico e aqueles de crescimento lento conseguem escapar. Já em 2019, Stone et al, em um estudo prospectivo, confirmaram a afirmação de Sionov (2009) que a heterorresistência ao fluconazol no complexo de espécies de *C. neoformans* é uma característica intrínseca e associada à virulência. Nesse estudo observaram a dissomia no cromossomo 1 (Chr 1) em isolados heterorresistentes o que correlacionava com aumento da CIM e da atividade da bomba de efluxo. Com o objetivo de se estudar a

heterorresistência vários tipos de estudos são utilizados apesar de não haver uma padronização de métodos e parâmetros.

### **Métodos para avaliação de heterorresistência**

Os métodos para avaliação da heterorresistência ainda não são padronizados. Sionov et al. em 2009 e Varma e Kwon-Chung em 2010, propuseram que esse teste seja realizado submetendo-se uma suspensão de célula do isolado a ser avaliado em meio de cultura contendo várias diferentes concentrações de FCL. Assim, são considerados heterorresistentes os isolados que crescem em concentrações superiores à CIM, determinada no teste de sensibilidade. O nível de heterorresistência ao fluconazol (NHF) é a máxima concentração do FCL que permite o crescimento de uma subpopulação do isolado.

Ensaio de indução a resistência a FCL também tem sido proposto (SIONOV et al., 2009; VARMA; KWON-CHUNG, 2010; FELICIANO et al., 2017). Nesses ensaios, os isolados são submetidos ao aumento gradativo do fármaco com o objetivo de induzir a células da colônia a sobrevivência na máxima concentração possível da substância inibitória (FELICIANO et al., 2017; SIONOV et al., 2009).

Ensaio de análise da estabilidade da heterorresistência também têm sido propostos (SIONOV et al., 2009; VARMA; KWON-CHUNG, 2010; FELICIANO et al., 2017). Nesses isolados heterorresistentes são cultivados em meios de cultura sem a droga indutora de heterorresistência. O objetivo desse tipo de ensaio é avaliar o número de passagens em meios de cultivo necessários para que os isolados demonstrem níveis de CIM similares aos observados antes das metodologias de avaliação de heterorresistência. O resultado do teste é o número de passagens em meio livre de fluconazol que foi necessário para o retorno da CIM inicial (VARMA; KWON-CHUNG, 2010).



### 3 OBJETIVOS

#### Objetivo geral

Investigar a heterorresistência ao fluconazol de isolados clínicos e ambientais do complexo de espécies *Cryptococcus neoformans* e complexo de espécies *Cryptococcus gattii* do estado do Amazonas.

#### Objetivos específicos

-Investigar a concentração inibitória mínima frente ao fluconazol de isolados clínicos e ambientais do complexo de espécies *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* do estado do Amazonas;

-Avaliar a existência de heterorresistência do complexo de espécies *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* do estado do Amazonas;

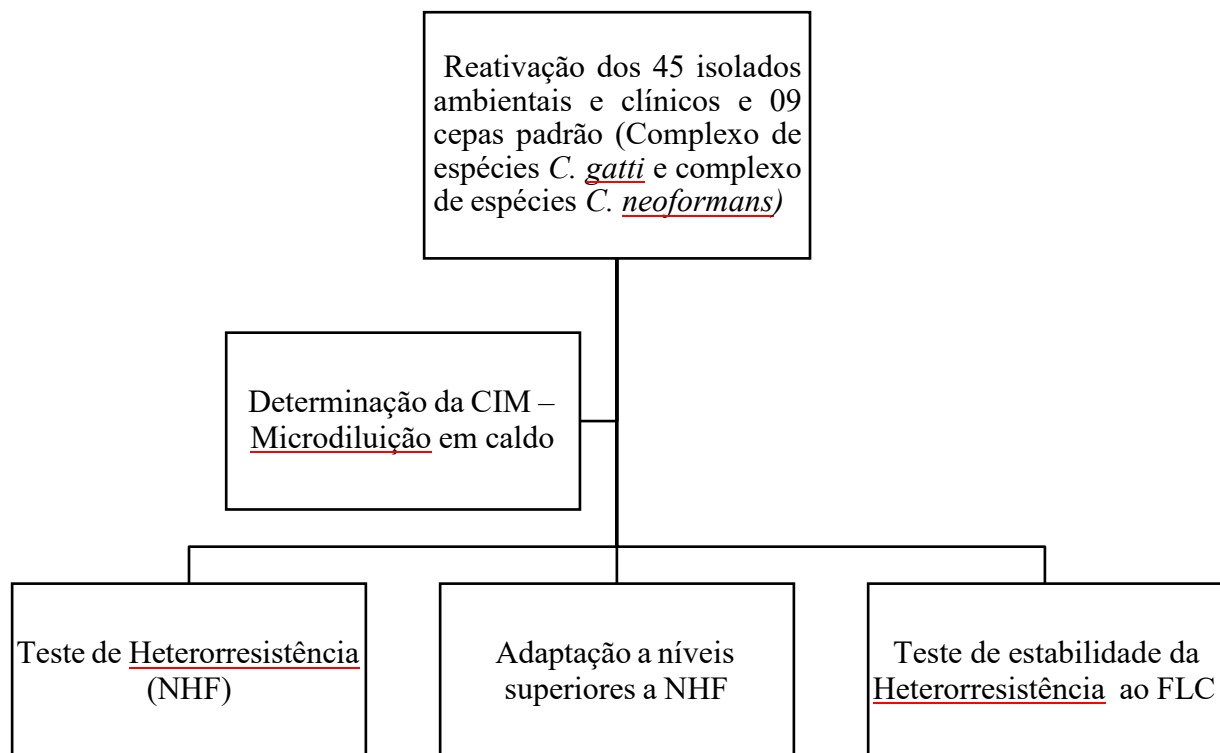
-Avaliar a adaptação a níveis superiores ao nível de heterorresistência frente ao fluconazol do complexo de espécies *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* do estado do Amazonas e

-Avaliar a estabilidade da heterorresistência dos isolados do complexo de espécies *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* do estado do Amazonas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### Fluxograma de atividade

O fluxograma abaixo mostra como este estudo foi conduzido (Figura 1)



**Figura 1**-Fluxograma das atividades realizadas no presente trabalho.

### Cepas de referência

No presente trabalho foram utilizadas as cepas padrão para *C. neoformans*(CFP 55, CFP 56, CFP 57, CFP 58 e H99) e *C. gattii*(CFP 59, CFP 60, CFP 61, CFP 62) (Tabela 2). As cepas de referência foram cedidas gentilmente pelo Prof.Dr. Wieland Meyer, da Universidade de

Sidney (Austrália), passadas ao Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz – IPEC/FIOCRUZ do Rio de Janeiro, as quais foram repassadas pela Prof<sup>a</sup>.Dra. Luciana Trilles ao Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane/AM, o qual através da Prof<sup>a</sup>. Dra.Ani Beatriz Jackisch Matsuura foi repassado a Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA.

<b>Nº do isolado</b>	<b>IPEC/FIOCRUZ</b>	<b>País</b>	<b>Fonte</b>	<b>MAT</b>	<b>TM</b>
WM 148	CFP 55	Austrália	Clínica	alfa	VNI
WM 626	CFP 56	Austrália	Clínica	alfa	VNII
WM 628	CFP 57	Austrália	Clínica	alfa	VNIII
WM 629	CFP 58	Austrália	Clínica	alfa	VNIV
WM 179	CFP 59	Austrália	Clínica	alfa	VGI
WM 178	CFP 60	Austrália	Clínica	alfa	VGII
WM 161	CFP 61	Austrália	Clínica	alfa	VGIII
WM 779	CFP 62	África do Sul	Veterinária	alfa	VGIV
H99					VNI

**Tabela 2**-Lista das cepas padrão que foram utilizadas no estudo, contendo algumas informações como tipo molecular (TM) e mating type (MAT).

### **Isolados clínicos e ambientais**

No presente estudo foram utilizados isolados ambientais e clínicos sendo ambientais 04 isolados de *Cryptococcus neoformans* e 05 isolados de *Cryptococcus gattii* e de origem clínica foram utilizados 27 isolados de *Cryptococcus neoformans* e 09 isolados de *Cryptococcus gattii*.

Os isolados ambientais utilizados são provenientes de amostras ambientais da cidade de Manaus/AM que foram depositados no acervo da Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA e foram gentilmente cedidos para esse projeto. Os isolados clínicos são de pacientes diagnosticados com criptococose, na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) no período de 2017 a 2019. Esses isolados clínicos fazem parte do projeto intitulado “Caracterização genotípica e sensibilidade a antifúngicos dos agentes causadores da criptococose no Estado do Amazonas”, aprovado pelo CEP da Fundação de Medicina Tropical “Doutor Vieira Dourado”, sob CAAE nº 90749718.3.0000.0005. Todos os 45 isolados foram previamente identificados em nível de tipo molecular pela técnica de PCR e PCR- RFLP.

## Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A determinação da CIM dos 45 isolados foi realizada, em duplicata, pelo método de referência de Microdiluição em Caldo da Norma M27- A4(CLSI, 2017). A técnica utiliza em microplaca estéril com 96 poços, a qual é dividida em 12 colunas (1 a 12) e 8 linhas (A-H).

O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma, St Louis, USA), com glutamina, sem bicarbonato e com o indicador vermelho de fenol. A alíquota utilizada do meio foi 100 µL em todos os poços da placa, com exceção do controle negativo (coluna 12), onde o volume foi dobrado.

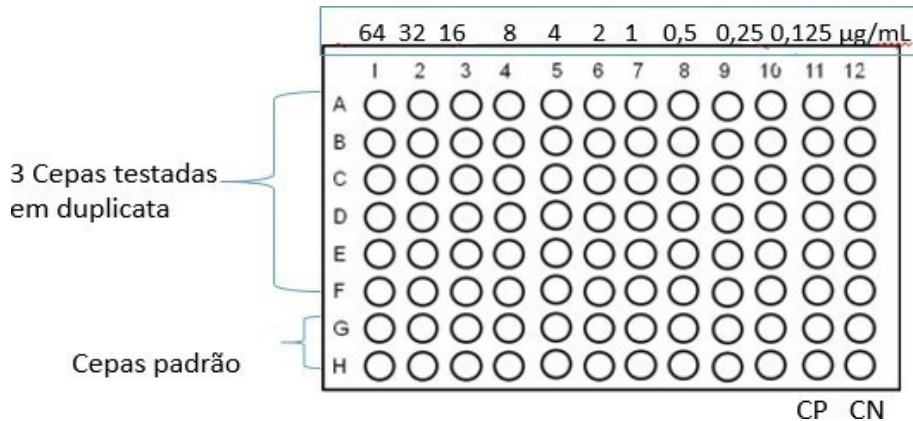
O antifúngico utilizado foi o FLC (Pfizer Laboratories) na forma de P.A (para análise). A solução padrão de FLC, na concentração de 5120 µg/mL, foi solubilizada em água destilada. As concentrações das soluções de uso foram preparadas de modo que as concentrações finais do antifúngico fosse de 0,125 a 64 µg/mL nas placas de microdiluição, após a adição do inóculo da levedura e do meio de cultura. O FLC foi distribuído nas colunas de 1 a 10, na alíquota de 100 µL, correspondendo cada coluna a uma concentração.

A suspensão do inóculo de cada isolado foi preparada a partir de cinco colônias com diâmetro de 1mm provenientes de repique em ágar Sabouraud-dextrose em 5 mL de solução salina estéril. A suspensão foi agitada em vórtex durante 15 segundos e a densidade celular ajustada com a câmara de Neubauer para concentração de  $1,0 - 5,0 \times 10^3$  cel/mL.

Adicionando 100 µL de cada inóculo nos poços das placas contendo o meio de cultura e o antifúngico a concentração final do inóculo foi de 0,5 a  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL. A alíquota de cada inóculo foi 100 µL nas colunas de 1 a 11. A coluna 11 foi o controle positivo, contendo meio de cultura e inóculo. Em cada placa foram testadas 3 isolados em duplicata, das linhas A a F. Para validação dos testes foram utilizadas cepas-padrão de *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilopsis* ATCC 22019, nas linhas G e H. As placas foram e incubadas em estufa a 30°C por 72 h. A leitura do resultado foi visual.

A concentração inibitória mínima (CIM) do FLC foi a que permitiu a inibição de 50% ou mais do crescimento de cada isolado, em relação ao observado no controle positivo. Devido ao fato de não haver um consenso na determinação do *breakpoint* para determinação da CIM para o complexo de espécies de *Cryptococcus* spp. foi seguida a orientação de Perfect e Cox, (1999) e Aller et al. (2000) os quais consideram  $\geq 16$  µg/mL um valor relevante. Acima desse valor de CIM o isolado foi considerado resistente ao FLC. A figura ilustra o esquema de preparação da

microplaca para o teste, CP é controle positivo (RPMI e inóculo) e CN controle negativo (apenas RPMI) (Figura 2).

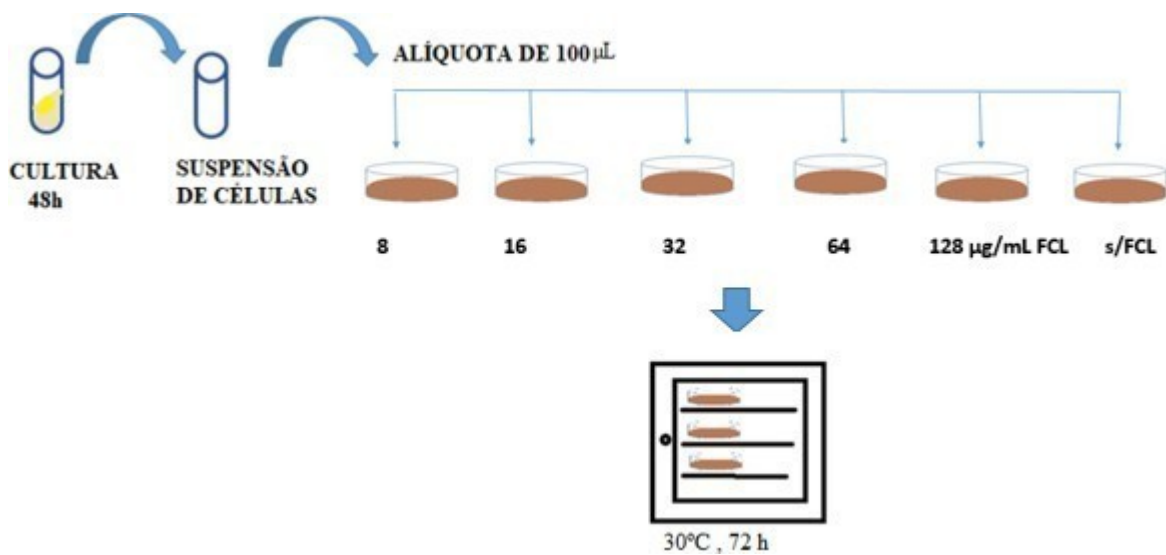


**Figura 2-** Esquema da placa de microdiluição usada para determinação da CIM contendo concentrações de fluconazol ( $\mu\text{g/mL}$ ), na qual CP indica a coluna usada para controle-positivo (controle de crescimento) e CN representa a do controle negativo (controle de esterilidade)

## Procedimentos para o teste de heterorresistência

### Avaliação do nível de heterorresistência ao FLC

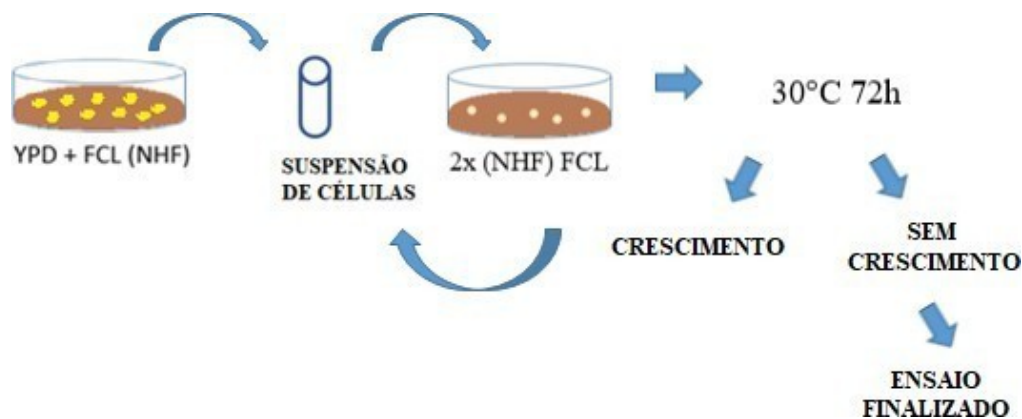
Os 45 isolados e 09 cepas padrão, após a determinação da CIM, passaram pelo teste de determinação do nível de heterorresistência ao FLC (NHF). Esse teste foi realizado como descrito por Sionov et al., (2009) e Varma; Kwon-Chung, (2010). A cepa-padrão H99, incluída no estudo pioneiro sobre heterorresistência, com valores de NHF, adaptação e estabilidade ao NHF conhecidos, foi utilizada como controle do teste de heterorresistência. Os isolados foram cultivados em ágar Sabouraud ( $30^{\circ}\text{C}$  por 48 h) e em seguida foi preparada uma suspensão de células em uma concentração de  $2,5 \times 10^3 \text{CFU/mL}$ . Essa suspensão de células ( $100 \mu\text{L}$ ) foi transferida para a superfície de placas de Petri contendo ágar YPD e FLC, nas concentrações de 8, 16, 32, 64, 128  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 3). Com exceção de 06 isolados, altamente resistentes, após a observação de alta frequência de heterorresistência, decidimos passar tais isolados a concentrações maiores de FLC, 256 e 516  $\mu\text{g/mL}$ . As placas foram incubadas a  $30^{\circ}\text{C}$  e a leitura foi feita após 72h. Os testes foram realizados em duplicata. No presente trabalho, entende-se por NHF a maior concentração de FLC que permitir o crescimento de colônias do isolado.



**Figura 3**-Esquema utilizado no presente trabalho para a realização do teste de nível de heterorresistência ao fluconazol (NHF).

#### Teste de adaptação a níveis de fluconazol superiores ao NHF

O objetivo desse teste foi avaliar a capacidade dos isolados que apresentaram heterorresistência, tolerando concentrações maiores de FCL, acima do NHF (Figura 4). Esse teste foi realizado como descrito por Feliciano et al. (2017), com modificações, utilizando a cepa H99 como controle do teste. Os isolados foram cultivados em ágar YPD (30°C por 72 h) na concentração de FCL determinada no ensaio do NHF (4.5.1). Em seguida, foi preparada uma suspensão de células em uma concentração de  $2,5 \times 10^3$  CFU/mL. Essa suspensão de células (100 µL) foi transferida para placa de Petri contendo o dobro da concentração de FCL do NHF (FELICIANO et al., 2017). As placas foram incubadas a 30°C de 72 a 96 h. Essa operação foi realizada em concentrações crescentes de FCL até a verificação da máxima concentração em que foi possível induzir o desenvolvimento do isolado. A concentração máxima utilizada foi 512 µg/mL. Um ensaio controle foi realizado semeando-se o isolado em meios YPD sem o antibiótico. Esse teste foi realizado em duplicata.



**Figura 4**-Esquema utilizado no presente trabalho para a realização do teste de adaptação a níveis superiores ao NHF.

#### Teste de estabilidade da heterorresistência ao fluconazol

Esse ensaio foi realizado como descrito por Sionov et al. (2009), Varma e Kwon-Chung, K.J. (2010) e Feliciano et al.(2017), com algumas modificações. Os isolados avaliados por esse ensaio foram aqueles que apresentaram NHF original  $\geq 16 \mu\text{g/L}$  e que se adaptaram a concentrações de FCL  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ . Foram selecionadas randomicamente 06 isolados, sendo 03 *C. gatti* e 02 *C. neoformans*, incluindo a cepa padrão H99. Foi preparada uma solução na concentração de  $2,5 \cdot 10^3 \text{ UFC/mL}$  do isolado, retirado  $50\mu\text{L}$  dessa solução e passada em caldo YPD fresco, sem fluconazol a  $30^\circ\text{C}$  por 24 horas, durante dez dias consecutivos, realizando assim 09 passagens. Paralelamente, após as 24 horas, em dias alternados, uma alíquota de  $50\mu\text{L}$  foi plaqueada em meio YPD com fluconazol nas concentrações de 16 a  $128 \mu\text{g/mL}$  para verificar se o isolado retornava à sua sensibilidade original, ou seja, ao NHF observado sem a indução de heterorresistência. Nesse ensaio, foi quantificado o número de passagens necessárias para o retorno ao NHF original (Figura 5). Esse teste foi realizado em duplicata.

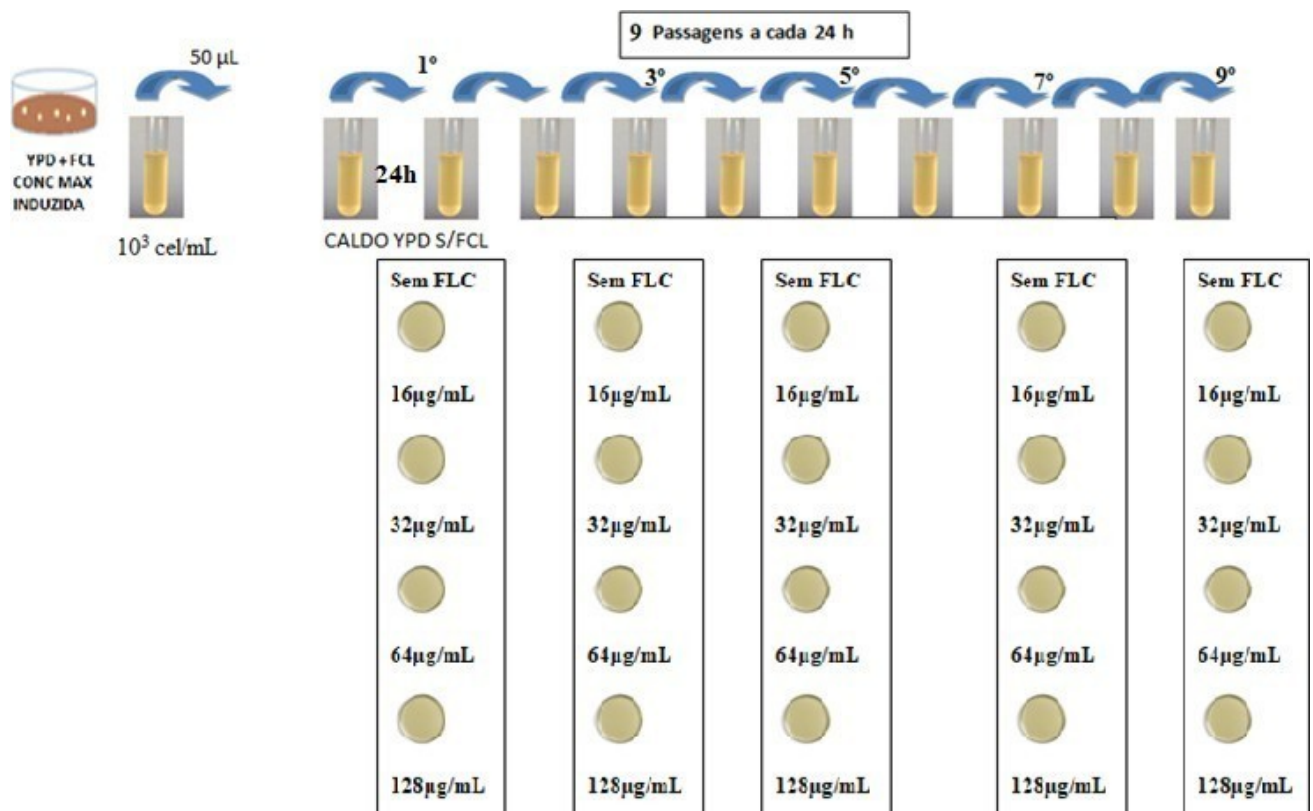


Figura 5-Esquema do teste de estabilidade da heterorresistência ao fluconazol

## Análise estatística

Analisamos os dados com testes de normalidade como Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov observamos que se tratava de dados não normais. Para obter dados normais, transformamos os dados brutos em dados de Log Natural (LN). Para os dados obtidos, no presente estudo, foram geradas as estatísticas descritivas (média, desvio padrão, valor mínimo e máximo). Para as análises entre dois grupos foram utilizados os testes *t* student (paramétrico) e/ou Mann Whitney (não paramétrico), para as análises entre 3 ou mais grupos foram aplicados os testes ANOVA (Análise de Variância) (paramétrico) e/ou Kruskal Wallis (não paramétrico), de acordo com a natureza dos dados (aplicando o teste de normalidade e/ou o check de variância). Para as comparações múltiplas (pós-teste) para ANOVA foram aplicados o pós teste Tukey's (*p* valor ajustado) e para Kruskal Wallis foram aplicados o pós teste Dunn's (*p* valor ajustado). Foram considerados significativos os valores de  $p \leq 0,05$  ( $\alpha \leq 5\%$ ). Os programas estatísticos utilizados para as análises foram: "Programa R", BioEstat 5.3 e o GraphPad Prism 8.4.3. Os gráficos foram gerados no Programa GraphPad Prism 8.4.3.



## 5 RESULTADOS

Os resultados do presente trabalho estão apresentados na forma de um artigo que está no formato e pretende-se submeter a Revista *Iberoamericana de Micología*.

### **Investigação da heterorresistência ao fluconazol de isolados clínicos e ambientais do complexo de espécies *Cryptococcus neoformans* e do complexo de espécies *Cryptococcus gattii* do estado do Amazonas**

Izabela de Mesquita Bácia Moreira<sup>1</sup>, Silviane Bezerra<sup>4</sup>, Juliana Gomes de Souza Oliveira<sup>3</sup>, Ana C. A. Cortez<sup>2</sup>, Aya Sadahiro<sup>5</sup>, João V. B. Souza,<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Av. General Rodrigo Octavio Jordão, 1200, 69067-005, Amazonas, Brasil.*

<sup>2</sup>*Departamento de Microbiologia Médica, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. Av. André Araújo, 2936, 69080-971, Amazonas, Brasil.*

<sup>3</sup>*Coleção de Microrganismo de Interesse Médico, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. Av. André Araújo, 2936, 69080-971, Amazonas, Brasil.*

<sup>4</sup>*Programa de Pós Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. Av. André Araújo, 2936, 69080-971, Amazonas, Brasil.*

<sup>5</sup>*Laboratório Imunologia Molecular, Departamento de Parasitologia, Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Av. General Rodrigo Octavio Jordão, 1200, 69067-005, Amazonas, Brasil*

E-mail: João V. B. d. Souza; [joao.souza@inpa.gov.br](mailto:joao.souza@inpa.gov.br)

### **Resumo**

A heterorresistência é um fenômeno que tem sido descrito quando se observa uma população aparentemente homogênea apresentar diferentes graus de suscetibilidade a um determinado antifúngico. O objetivo deste estudo foi investigar a heterorresistência ao fluconazol de isolados clínicos e ambientais do complexo de espécies *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* do estado do Amazonas-Brasil. Foram analisados 45 isolados e 09 cepas padrão. Os testes realizados foram a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), teste de nível de heterorresistência ao fluconazol (NHF), teste de adaptação à níveis de FCL acima de NHF e o teste de estabilidade de heterorresistência. Os isolados clínicos do complexo de *Cryptococcus*

*gattii* apresentaram CIM superior aos isolados ambientais. Todos os isolados clínicos e ambientais demonstraram heterorresistência ao fluconazol e significativa parte apresentou valores de NHF superior a 16 µg/mL. No experimento de adaptação, significativa parte dos isolados foram capazes de apresentar crescimento em concentrações de fluconazol ainda maior que o NHF. Após nove repiques em meios de cultivo sem fluconazol, os fungos submetidos ao experimento de adaptação tiveram seu NHF reduzido, no entanto, no período, nenhum NHF retornou ao valor do NHF original. Os experimentos demonstraram que, em média, o valor do NHF dos isolados foi 15 vezes maior que a CIM original. Os experimentos demonstraram ainda que após o experimento de adaptação o valor do NHF foi 59 vezes maior que o valor da CIM original. Portanto, a maior parte dos isolados apresentaram valores de NHF muito superiores a 16 µg/mL. Esses resultados colocam em discussão a relevância clínica do ensaio de CIM e motivam o desenvolvimento de estudos in vivo para medir o impacto da heterorresistência no curso da criptococose.

**Palavras chaves:** Complexo de espécies de *Cryptococcus neoformans*, complexo de espécies de *Cryptococcus gattii*, heterorresistência, criptococose.

## 1. Introdução

A criptococose é uma doença fúngica grave com distribuição mundial causada pelo complexo das espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. A meningite criptocócica é a principal manifestação da criptococose. Foi estimado que 223.100 casos de doença criptocócica ocorram anualmente em todo o mundo, com aproximadamente 181.100 mortes (RAJASINGHAM et al., 2017). Esta doença afeta pacientes imunocomprometidos, particularmente aqueles com AIDS e hospedeiros aparentemente imunocompetentes (NYAZIKA et al., 2018).

O fluconazol (FCL) é um tratamento medicamentoso anticriptocócico utilizado em altas doses, por longos períodos, principalmente em países onde a fluocitosina não é licenciada, como o Brasil (PERFECT et al., 2010). Casos de falhas na terapia clínica de criptococose estão relacionados com o surgimento de mutantes resistentes aos azóis ou clones heterorresistentes (MONDON et al., 1999; SIONOV et al. 2010; BAND, WEISS, 2019).

A heterorresistência é um fenômeno adaptativo, onde isolados produzem culturas com suscetibilidade heterogênea, a maior parte das células são suscetíveis, mas foram recuperadas com frequência variável, células altamente resistentes à droga (MONDON et al., 1999). A falha inexplicável do tratamento é significativa e a heterorresistência é uma causa possível (BAND, WEISS, 2019). Esse fenômeno é frequentemente estudado em relação às bactérias, sendo

necessário entendê-lo melhor com os fungos. Existem alguns estudos que investigam a heterorresistência em isolados dos complexos patogênicos de *Cryptococcus* spp. Em 2013, Sionov et al. demonstraram o surgimento de clones resistentes no cérebro de ratos, durante o tratamento com FCL, Ferreira et al. (2015), avaliaram as alterações morfológicas e o aumento da virulência em *Cryptococcus gattii*. Recentemente, Feliciano et al. (2017) investigaram o nível de heterorresistência ao FCL em 100 cepas clínicas e ambientais do complexo de espécies de *Cryptococcus* spp. do Sudeste brasileiro. Apesar dos esforços regionais para investigar os agentes que causam a criptococose no estado do Amazonas, Brasil, poucos estudos avaliaram a sensibilidade de isolados regionais aos antifúngicos. Quanto à heterorresistência, nenhum estudo regional foi realizado. O presente trabalho obteve resultados para enriquecer a discussão sobre heterorresistência ao FCL de isolados clínicos e ambientais do Norte do país e tem como principais beneficiados os pacientes acometidos pela criptococose.

## 2 Materiais e métodos

### Microrganismos

Foram testados 45 isolados, sendo 31 *Cryptococcus neoformans* (VNI) e 14 isolados *Cryptococcus gatti* (VGI e VGII), de origem clínica e ambiental. Os isolados clínicos foram obtidos do líquido cefalorraquidiano de pacientes com diagnóstico de criptococose, na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) de 2017 a 2019. Os isolados ambientais são provenientes da coleção de fungos de interesse médico do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e foram gentilmente fornecidos para este projeto. Além disso, incluímos nove cepas de *C. neoformans* (CFP 55, CFP 56, CFP 57, CFP 58 e H99) e *C. gattii* (CFP 59, CFP 60, CFP 61, CFP 62).

### Teste de sensibilidade

A concentração inibitória mínima (CIM) de FLC foi determinada pelo método de microdiluição em caldo de acordo com as recomendações propostas pelo CLSI M27-A4 (2017). A solução estoque de fluconazol, a uma concentração de 512 µg/mL, foi diluída em meio RPMI 1640. A concentração do inóculo de levedura foi ajustada de  $1 \times 10^3$  a  $5 \times 10^3$  células / mL. Em cada poço da placa de microdiluição foram dispensados 100 µL de meio RPMI 1640, 100 µL de agente antifúngico e 100 µL do inóculo. O *endpoint* da CIM do FLC foi lido visualmente após

72h de incubação a 30°C, foi definido como a menor concentração que inibiu 50% ou mais do crescimento de cada isolado, em comparação com o controle positivo. Como controle de qualidade, usamos as leveduras padrão *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e incluídos em cada teste (YAMAZUMI et al., 2003).

### **Nível de heterorresistência ao fluconazol (NHF)**

Este teste foi realizado conforme descrito por Sionov et al., (2009) e Varma; Kwon-Chung, (2010) com modificações. As suspensões de células ( $2,5 \times 10^3$  CFU / mL) dos 45 isolados e 09 cepas em solução salina estéril foram plaqueados em ágar YPD contendo FCL (8 a 128 µg/mL), com exceção de sete isolados. Na literatura encontramos no teste da heterorresistência o uso da concentração máxima de 128 µg/mL, mas devido o crescimento fúngico com frequência de heterorresistência alta em sete isolados, foi necessário a continuação do teste em concentrações de 256 e 512 µg/mL. A determinação do NHF foi lida após 72h de incubação a 30°C e o isolado foi considerado como heterorresistente quando as colônias cresceram em uma placa contendo fluconazol em concentração superior à CIM. A frequência de células capazes de se adaptar ao NHF foi calculada pela contagem de UFC em meio ágar YPD isento de fluconazol, como controle positivo de crescimento e contagem em ágar YPD com FCL na concentração do NHF de cada isolado. A porcentagem foi obtida na relação ufc heterorresistentes/ ufc total.

### **Teste de adaptação a níveis superiores ao NHF**

Nesse teste observou se a capacidade de todos os isolado em tolerar concentrações maiores que o nível de heterorresistência ao fluconazol de modo gradual. Os isolados foram mantidos nas concentrações do NHF. Em seguida, foi preparada a suspensão de cada isolado e semeada em placas de YPD contendo fluconazol em concentrações duas vezes maior que o valor do NHF. As placas foram incubadas a 30 ° C de 72 à 96h. As colônias que cresceram foram repassadas para outra placa contendo quatro vezes o valor da concentração do NHF, assim sucessivamente até a concentração máxima de 512µg/mL. Placas contendo YPD sem fluconazol foram usadas como controle positivo do crescimento fúngico (FELICIANO et al.,2017; SIONOV et al.). Foi observada a máxima concentração de FCL que cada isolado foi capaz de se adaptar.

### **Teste de estabilidade da heterorresistência ao fluconazol**

Selecionadas aleatoriamente 05 subpopulações altamente resistentes (02 *C. neoformans* e 03 *C. gatti*) e a cepa H99, ou seja, que se adaptaram a concentrações  $\geq 64\mu\text{g/mL}$ , mas que originalmente manifestavam heterorresistência  $\geq 16\mu\text{g/mL}$  foram usadas para estudar a estabilidade de seu fenótipo de resistência. A partir da maior concentração em que cada isolado se adaptou, foi feita uma suspensão e retirado uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$ , transferido para 5 mL de caldo YPD fresco livre de antifúngico após incubação a 30 ° C durante 24 h. Nove transferências foram realizadas diariamente para cada isolado, durante dez dias. Paralelamente, em dias alternados, foi realizado o plaqueamento de 50  $\mu\text{L}$  da suspensão após 24h, em ágar YPD e ágar YPD mais FLC(16 a 128 $\mu\text{g/mL}$ ) e incubadas a 30 ° C por 72 h para verificar se o isolado retornava à sua sensibilidade original, ou seja, ao NHF observado sem a indução de heterorresistência. Nesse ensaio, foi quantificado o número de passagens necessárias para o retorno ao NHF original (FELICIANO et al.,2017; SIONOV et al.,2010; VARMA, KWON-CHUNG, 2010).

### **Análise estatística**

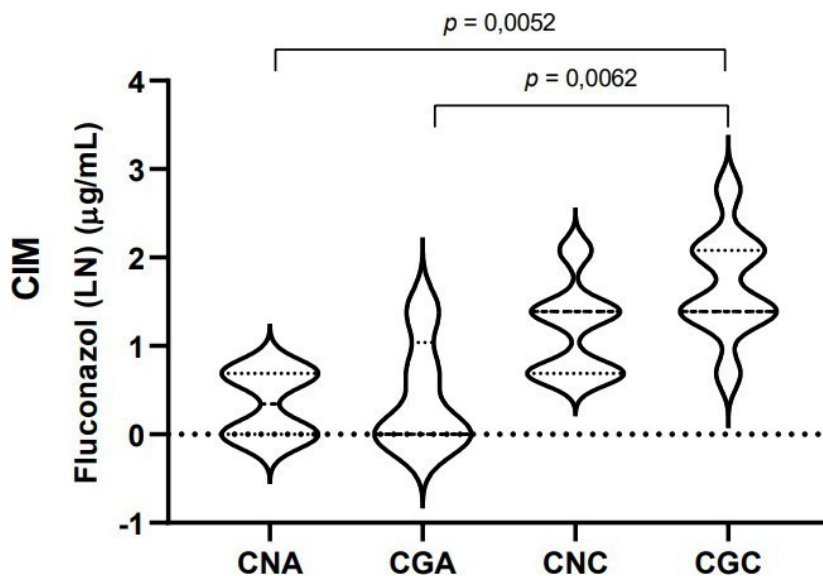
Analisamos os dados com testes de normalidade como Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov observamos que se tratava de dados não normais. Para os dados obtidos, no presente estudo, foram gerados as estatísticas descritivas (média, desvio padrão, valor mínimo e máximo). Para as análises entre dois grupos foram utilizados os testes *t* student (paramétrico) e/ou Mann Whitney (não paramétrico), para as análises entre 3 ou mais grupos foram aplicados os testes ANOVA (Análise de Variância) (paramétrico) e/ou Kruskal Wallis (não paramétrico), de acordo com a natureza dos dados (aplicando o teste de normalidade e/ou o check de variância). Para as comparações múltiplas (pós-teste) para ANOVA foram aplicados o pós teste Tukey's (*p* valor ajustado) e para Kruskal Wallis foram aplicados o pós teste Dunn's (*p* valor ajustado). Foram considerados significativos os valores de  $p \leq 0,05$  ( $\alpha \leq 5\%$ ). Os programas estatísticos utilizados para as análises foram: “ Programa R”, BioEstat 5.3 e o GraphPad Prism 8.4.3. Os gráficos foram gerados no Programa GraphPad Prism 8.4.3

### 3 Resultados

Com a finalidade de conhecer a convencional CIM dos isolados clínicos e ambientais frente ao Fluconazol, os isolados foram submetidos ao ensaio de determinação CIM por ensaio de concentração resposta em microdiluição. Os dados obtidos passaram por testes de normalidade e foram considerados não normais. Como alternativa transformamos os dados em Logaritmo Natural (LN) e assim foram considerados normais, fizemos os testes paramétricos ANOVA e para múltiplas comparações, usamos o teste de Tukey. A Tabela 1 apresenta valores da CIM de cada conjunto dos isolados ambientais e clínicos, frente ao FCL, sendo calculada a média aritmética e o desvio padrão. A Figura 1 apresenta um gráfico do tipo “violinplot” com os valores da CIM( $\mu\text{g/mL}$ ) dos quatro grupos de isolados transformados em Logaritmo Natural (LN), a partir do teste paramétrico de múltiplas comparações, teste de Tukey.

Isolados	Número de isolados	Média Aritmética	Desvio Padrão	Valor mínimo	Valor máximo
<i>C. neoformans</i> ambientais	4	1,5	0,6	1	2
<i>C. gattii</i> ambientais	5	1,7	1,4	0,5	4
<i>C. neoformans</i> clínicos	27	3,7	2,1	2	8
<i>C.gattii</i> clínicos	9	6,4	4,2	2	16

**Tabela 3**-Valor da média aritmética, desvio padrão e valores mínimos e máximos da concentração inibitória mínima (CIM em  $\mu\text{g/mL}$ ), determinados pelo método de microdiluição dos isolados do Norte do país, clínicos e ambientais do complexo de espécies de *C.neoformans* /*C. gattii* frente ao fluconazol.



**Figura 6** - Violin-Plot: valores da concentração inibitória mínima (CIM em  $\mu\text{g/mL}$ ) determinada pelo método de microdiluição dos isolados clínicos e ambientais do Norte do Brasil do complexo de espécies de *C. neoformans* / *C. gattii* frente ao fluconazol transformados em Logaritmo Natural (LN) a partir do Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). CNA – *Cryptococcus neoformans* ambiental, CGA – *Cryptococcus gattii* ambiental, CNC – *Cryptococcus neoformans* clínico, CGC – *Cryptococcus gattii* clínico.

Os isolados de *C. gattii* clínico apresentaram maior média da CIM,  $6,4\mu\text{g/mL}$ , seguidos dos isolados *C. neoformans* clínicos,  $3,7\mu\text{g/mL}$ ; *C. gattii* ambiental,  $1,7\mu\text{g/mL}$  e *C. neoformans* ambiental,  $1,5\mu\text{g/mL}$  (Tabela 1). Após os valores serem transformados em Logaritmo Natural (LN), os testes paramétricos apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e pelo teste de Tukey de múltiplas comparações observamos diferença significativa entre os seguintes grupos: isolados de *C. neoformans* ambiental e entre *C. gattii* clínico e entre *C. gattii* ambiental e *C. gattii* clínico, como pode ser observado na Figura 6. Dessa forma, pode-se observar que, os isolados clínicos apresentaram CIM maior que os isolados ambientais no Complexo de espécies de *Cryptococcus gattii*, apesar de observamos a mesma tendência nos isolados do Complexo de Espécies de *C. neoformans* não foi observado diferença estatística entre os isolados clínicos e ambientais neste complexo de espécie. O valor de CIM  $\geq 16\mu\text{g/mL}$ , ocorreu apenas em isolados clínicos de *C. gattii*, 11,1% (1/9).

Com a finalidade de verificar a frequência de células capazes de se adaptar ao NHF foi quantificado o nível de heterorresistência ao fluconazol por meio da avaliação do crescimento dos isolados em meios com concentração final de fluconazol maior que a CIM dos isolados. A Tabela 4 apresenta a CIM, o nível de heterorresistência ao fluconazol e também % de células capazes de se desenvolver no NHF (frequência de heterorresistência %).

Espécie	Identificação	Tipos moleculares	CIM( $\mu\text{g/mL}$ )	NHF( $\mu\text{g/mL}$ )	Freq de hetero (%)
<i>C. gattii</i> Ambiental (n=5)	6069	VGII	1	8	5,8
	6117	VGII	0,5	16	1,17
	6141	VGII	4	16	4,5
	6089	VGII	1	16	5,8
	6138	VGII	2	8	1,9
<i>C. neoformans</i> (n=4) Ambiental	6021	VNI	2	16	0,6
	6179	VNI	2	32	6,7
	6190	VNI	1	8	0,8
	6205	VNI	1	8	2,5
<i>C. gattii</i> (n= 9) Clínico	66	VGII	4	8	0,85
	103	VGII	8	32	6,6
	215	VGII	4	128	2,9
	339	VGII	4	32	0,9
	829	VGII	8	32	0,6
	111	VGII	4	256	8,4
	606	VGI	2	16	3,6
	754	VGII	8	32	2,1
	745	VGII	16	256	5,3
<i>C. neoformans</i> (n=27) Clínico	69	VNI	2	16	0,9
	94	VNI	2	16	0,9
	148	VNI	4	16	11,6
	272	VNI	4	16	1,3
	298	VNI	2	16	1,7
	330	VNI	4	128	11,8
	452	VNI	2	16	2,3
	526	VNI	2	16	0,9
	545	VNI	2	32	0,7
	624	VNI	2	32	2,4
	693	VNI	2	16	5,6
	722	VNI	2	16	3,4
	746	VNI	8	256	1,45
	755	VNI	4	8	8
	773	VNI	4	16	2,7
	842	VNI	4	512	49
	854	VNI	4	128	2,3
911	VNI	8	64	0,6	
932	VNI	4	16	1,2	
935	VNI	4	16	2,5	



	953	VNI	8	32	2,2
	962	VNI	2	16	5,5
	1002	VNI	2	8	10,7
<i>C. neoformans</i>	1052	VNI	8	256	0,42
(n=27)	1072	VNI	4	16	0,5
Clínico	21.02	VNI	4	16	3,6
	606.02	VNI	2	128	12,2
Linhas Padrão	H99	VNI	2	32	13
<i>C. neoformans</i>	CFP 55	VNI	4	256	0,6
	CFP 56	VNII	0,25	8	13,3
	CFP 57	VNIII	8	32	8,7
	CFP 58	VNIV	1	128	0,74
<i>C. gattii</i>	CFP 59	VGI	1	64	2,7
	CFP 60	VGII	2	16	13,3
	CFP 61	VGIII	1	128	3,1
	CFP 62	VGIV	1	128	6

**Tabela 4** -Valores da concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/ml}$ ), do nível de heterorresistência ao fluconazol ( $\mu\text{g/ml}$ ) e frequência de heterorresistência (%) de todos os isolados ambientais e clínicos e cepas de referência do complexo de espécies de *C. neoformans* /*C. gattii*.

Todos os 45 isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* exibiram heterorresistência, ou seja todos foram capaz de crescer em concentrações superiores à CIM (Tabela 2). Os isolados de *C. gattii* clínicos apresentaram maior média de NHF, no valor de  $88\mu\text{g/mL}$ , seguidos de *C. neoformans* clínico,  $67,6\mu\text{g/mL}$ , *C. neoformans* ambientais,  $16\mu\text{g/mL}$  e *C. gattii* ambientais,  $12,8\mu\text{g/mL}$  (Tabela 3). Nas análises realizadas com os dados brutos e transformados a LN em testes paramétricos e não paramétricos não houve diferença significativa do NHF entre os grupos de isolados ( $p < 0,05$ ) (Figura 2).

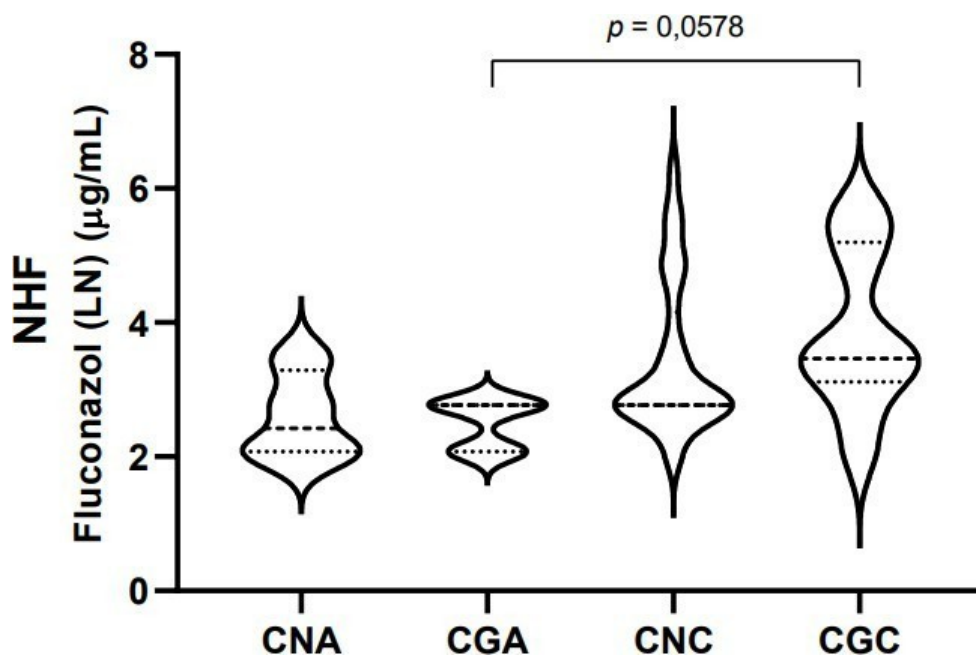
Isolados	Número de Isolados	Média aritmética	Desvio Padrão	Valor mínimo	Valor máximo
<i>C. neoformans</i> ambientais	4	16	11,3	8	32
<i>C. gattii</i> ambientais	5	12,8	4,4	8	16
<i>C. neoformans</i> clínicos	27	67,6	112,7	8	512

<i>C.gattii</i> clínicos	9	88	101,4	8	256
-----------------------------	---	----	-------	---	-----

**Tabela 5** - Valor da média aritmética, desvio padrão, valores mínimo e máximo do nível de heterorresistência ao fluconazol (NHF em  $\mu\text{g/mL}$ ), dos isolados do Norte do país, clínicos e ambientais do complexo de espécies de *C.neoformans* /*C. gattii* frente ao fluconazol.

Neste estudo, encontramos a frequência de crescimento fúngico no NHF de 0,4 a 12,2 %, excluindo um isolado de *C.neoformans*, VNI, de origem clínica, 842, que apresentou frequência de 49% a 512 $\mu\text{g/mL}$ .

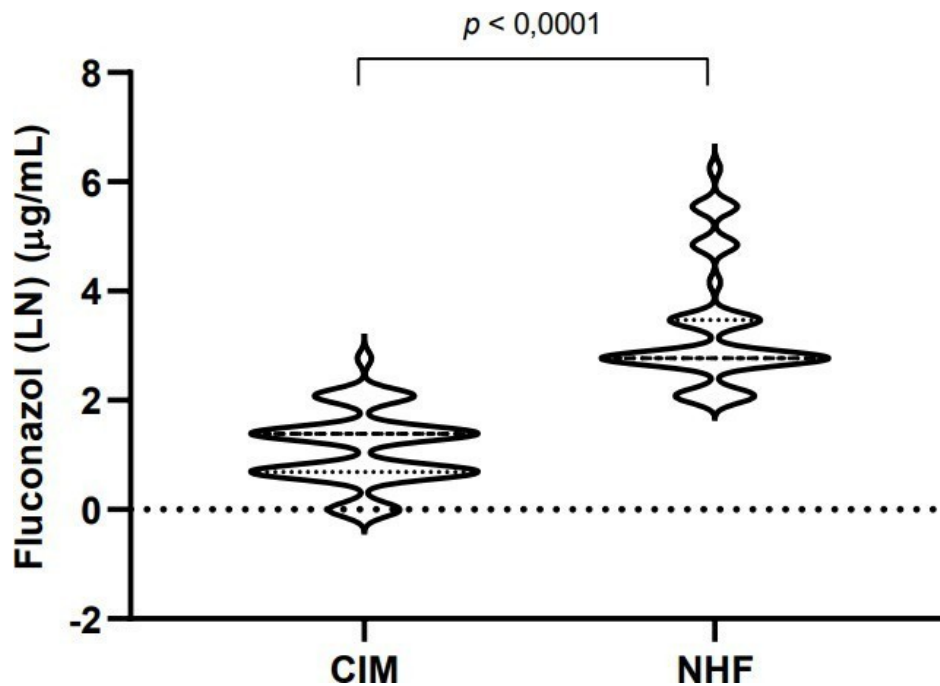
Os isolados que exibiram subpopulações resistentes ao FLC a uma concentração  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$  foi a seguinte: *C. neoformans*: 92,6 % clínica, 50% ambiental, e *C gattii*: 89 % clínica e 60% ambiental.



**Figura 7**- Violin- Plot: Valor do nível de heterorresistência ao fluconazol (NHF em  $\mu\text{g/mL}$ ) dos isolados do Norte do Brasil, clínicos e ambientais do complexo de espécies de *Cryptococcus* spp. transformados em Logaritmo Natural (LN). CNA – *Cryptococcus neoformans* ambiental, CGA – *Cryptococcus gattii* ambiental, CNC – *Cryptococcus neoformans* clínico, CGC – *Cryptococcus gattii* clínico.

Houve diferença significativa entre os valores de CIM e NHF, nos testes paramétricos com os dados transformados em Logaritmo Natural ( $p < 0,05$ ) (Figura 3). Na comparação entre as médias dos valores de CIM e NHF por grupo de isolados observamos que os valores de NHF foram 18,2 vezes maiores que a CIM nos isolados de *C. neoformans* clínico; 13,7 vezes nos isolados de *C.gattii* clínico; 10,7 vezes nos isolados de *C. neoformans* ambiental e 7,5 vezes nos isolados de *C.gattii* ambiental. Na comparação em dois grupos, de modo global, comparando

todos os valores de CIM com todos os valores do NHF, obtivemos diferença significativa ( $p < 0,05$ ), nos testes paramétricos, como observamos na Figura 3. Os valores de NHF foram superiores aos valores de CIM em 15,9 vezes.



**Figura 8** -Violin-Plot: Comparação dos valores da concentração inibitória mínima (CIM em µg/mL) e nível de heterorresistência ao fluconazol (NHF em µg/mL) dos isolados do Norte do Brasil, clínica e ambiental do complexo de espécies de *C.neoformans/C. gattii*, analisados em dois grupos, com os valores transformados em Logaritmo Natural e analisados pelo teste paramétrico, Teste *t*student ( $p < 0,05$ ). CNA – *Cryptococcus neoformans* ambiental, CGA – *Cryptococcus gattii* ambiental, CNC – *Cryptococcus neoformans* clínico, CGC – *Cryptococcus gattii* clínico.

Com a finalidade de investigar se os isolados poderiam se adaptar a concentrações superiores ao NHF foi realizado ensaio de adaptação forçada dos isolados a concentrações de fluconazol ainda maiores que o NHF. O teste de indução foi realizado com todos os isolados. Em adição, os isolados que foram capazes de se adaptar a concentrações maiores NHF foram avaliados quanto a “Estabilidade da adaptação”, ou seja, verificou-se a quantidade de repiques em meio de cultura sem fluconazol necessários para o retorno da linhagem ao NHF original. A Tabela 4 apresenta o nível de adaptação máxima ao fluconazol e a estabilidade, número de repiques para o retorno da linhagem ao NHF.

Espécie	Identificação	NHF( $\mu\text{g/mL}$ )	Adaptação Máxima ( $\mu\text{g/mL}$ )	Número de repiques (NHF após esses repiques)
(n=5)	6069	8	256	9 (128 $\mu\text{g/mL}$ )
<i>C. gattii</i>	6117	16	256	NR
Ambiental	6141	16	512	NR
	6089	16	64	NR
	6138	8	256	NR
<i>C. neoformans</i>	6021	16	NA	NR
(n=4)	6179	32	128	NR
Ambiental	6190	8	NA	NR
	6205	8	256	9 (128 $\mu\text{g/mL}$ )
<i>C. gattii</i>	66	8	512	9 (128 $\mu\text{g/mL}$ )
(n=9)	103	32	NA	NR
<i>Clinico</i>	215	128	512	NR
	339	32	512	NR
	829	32	512	9 (128 $\mu\text{g/mL}$ )
	111	256	512	NR
	606	16	NA	NR
	754	32	NA	NR
	745	256	NA	NR
(n=27)	69	16	NA	NR
<i>C. neoformans</i>	94	16	NA	NR
Clínico	148	16	NA	NR
	272	16	128	NR
	298	16	512	NR
	330	128	NA	NR
	452	16	NA	NR
	526	16	512	NR
	545	32	64	NR
	624	32	NA	NR
	693	16	256	NR
	722	16	NA	NR
	746	256	512	NR
	755	8	NA	NR
	773	16	256	NR
	842	512	512	NR
	854	128	256	NR
	911	64	256	NR
	932	16	256	9 (128 $\mu\text{g/mL}$ )
	935	16	512	NR
	953	32	NA	NR
	962	16	256	NR
	1002	8	NA	NR
	1052	256	NA	NR
	1072	16	512	NR

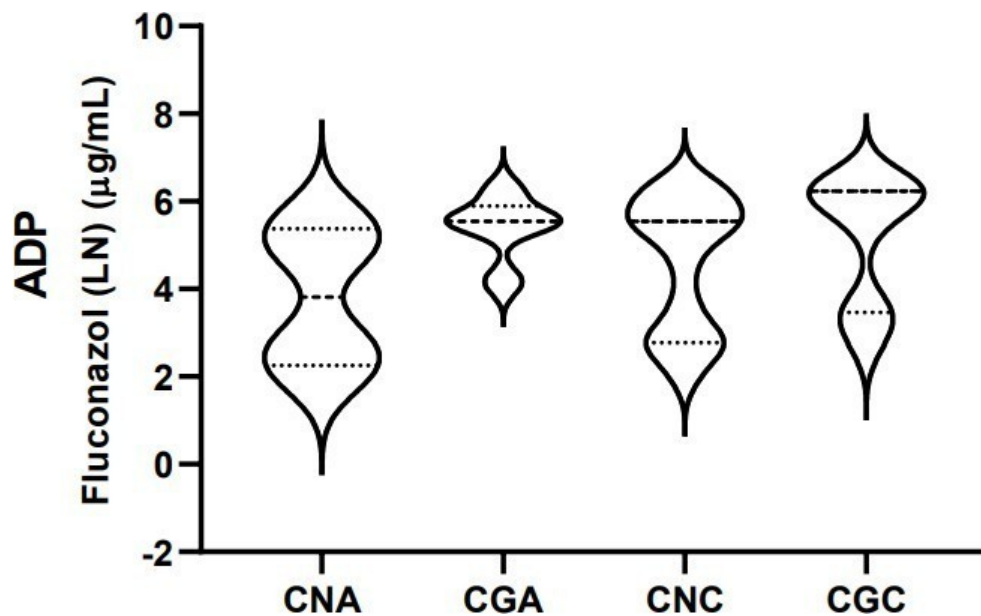
	21.02	16	NA	NR
	606.02	128	256	NR
<i>C. neoformans</i>	H99	32	128	9 (128 µg/mL)
	CFP 55	256	256	NR
	CFP 56	8	64	NR
	CFP 57	32	128	NR
	CFP 58	128	256	NR
<i>C. gattii</i>	CFP 59	64	64	NR
	CFP 60	16	64	NR
	CFP 61	128	256	NR
	CFP 62	128	256	NR

**Tabela 6** -Valores do nível de heterorresistência ao fluconazol (NHF), nível de adaptação máxima ao fluconazol (µg/mL), número de repiques, NHF após os repiques em meio de cultura sem fluconazol dos isolados do Norte do Brasil, clínico e ambientais e das cepas de referência do complexo de espécies de *C.neoformans* /*C. gattii*.NA: Não adaptou; NR: Não realizado

Em relação à capacidade de adaptação a concentrações de FLC superior ao NHF, entre os isolados ambientais, verificou se que 100% dos isolados de *C.gattii* e 50% dos isolados de *C. neoformans* tiveram capacidade de adaptação. Já entre os isolados clínicos houve adaptação de 55,6 % dos isolados de *C.neoformans* e de *C.gattii* (Tabela 4). Para calcular a média dos valores de adaptação, os isolados que não adaptaram a concentrações superiores ao nível de heterorresistência ao fluconazol (NHF) foi considerada a maior concentração de fluconazol que cada isolado foi capaz de cresce, ou seja, seu NHF. A média dos valores de adaptação dos isolados foram as seguintes: *C. gattii* clínico 321, 8µg/mL; *C. gattii* ambiental , 268,8µg/mL; *C. neoformans* clínico, 208 µg/mL e *C. neoformans* ambiental 102 µg/mL (Tabela 5). No teste não paramétrico de Kruskal-Wallis não houve diferença significativa entre os grupos de isolados ( $p < 0,05$ ) (Figura 4).

Isolados	Número de isolados	Média aritmética	Desvio Padrão	Valor mínimo	Valor máximo
<i>C. neoformans</i> ambientais	4	102	116,4	8	256
<i>C. gattii</i> ambientais	5	268,8	159,4	64	512
<i>C. neoformans</i> clínicos	27	208	193,1	8	512
<i>C. gattii</i> clínicos	9	321,8	236,3	16	512

**Tabela 7-** Valor da média aritmética, desvio padrão e valores mínimo e máximo dos valores da adaptação acima do nível de heterorresistência ao fluconazol ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos isolados do Norte do Brasil, clínicos e ambientais, do complexo de espécies de *C. neoformans* / *C. gattii* frente ao fluconazol.



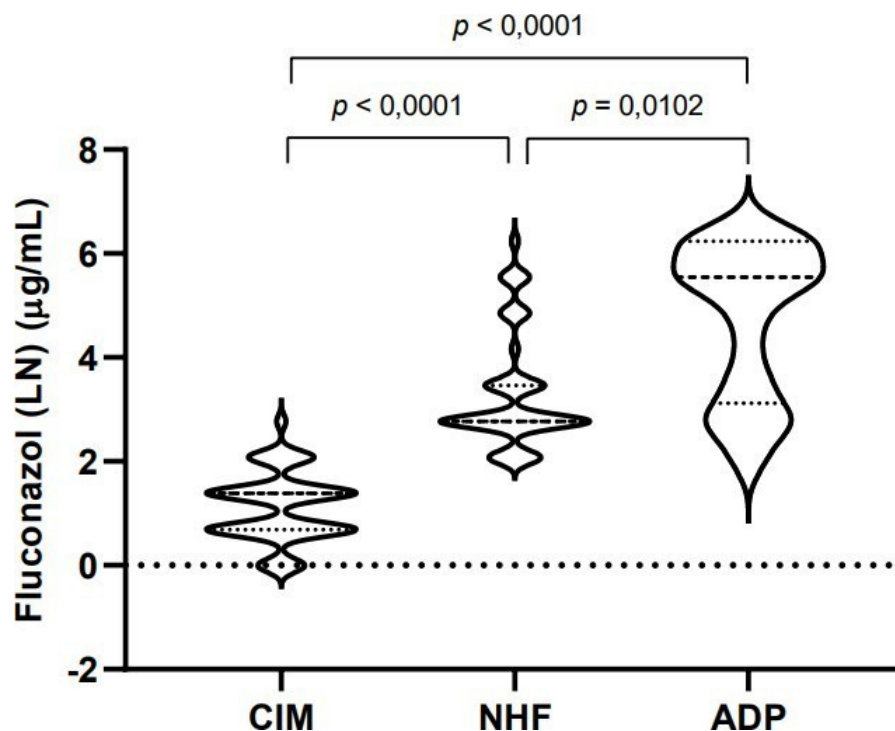
**Figura 9** - Violin- Plot: Valor da adaptação superior ao nível de heterorresistência ao fluconazol ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos isolados clínicos e ambientais do complexo de espécies de *C. gattii* / *C. neoformans* transformados em Logaritmo Natural (LN). CNA – *Cryptococcus neoformans* ambiental, CGA – *Cryptococcus gattii* ambiental, CNC – *Cryptococcus neoformans* clínico, CGC – *Cryptococcus gattii* clínico.

Comparando as medianas do NHF e do resultado da adaptação a concentrações superiores ao nível de heterorresistência ao fluconazol observamos a mesma ordem decrescente,

isolados de *C. gatti* clínico com valores maiores, seguidos de valores iguais dos isolados de *C. gatti* ambiental e *C. neoformans* clínicos e valores menores de *C. neoformans* ambiental.

A estabilidade da heterorresistência frente ao FCL, foi avaliada utilizando a cepa H99 e 05 subpopulações de isolados que originalmente manifestaram heterorresistência  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$  e adaptaram  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ , selecionadas aleatoriamente, 03 isolados *C. gattii* (sendo 01 isolado ambiental e 02 isolados clínicos) e 02 isolados de *C. neoformans* (sendo 01 isolado ambiental e 01 isolado clínico). No teste de estabilidade foi avaliado o número de repiques necessários para que os isolados retornassem ao NHF original. Os isolados foram inoculados em caldo YPD sem antifúngico e incubados a  $30^\circ \text{C}$  por 24h. Após cada 24h, em dias alternados, alíquota da suspensão foi retirada e inoculada em placas contendo ágar YPD com FCL em distintas concentrações ( $16 \mu\text{g/mL}$  a  $128 \mu\text{g/mL}$ ) e ágar YPD sem FCL, como controle de crescimento, para avaliar o retorno ao NHF inicial. O mesmo processo foi repetido durante dez dias, com nove transferências diárias para cada isolado. Os isolados mostraram estabilidade da heterorresistência durante as nove transferências diárias, não retornando ao NHF original como indicado na Tabela 4.

Na comparação entre os testes da CIM, NHF e Adaptação a níveis superiores ao NHF (ADP), por teste não paramétrico (Teste Kruskal Wallis seguido do Teste de múltiplas comparações de Dunn), com os dados transformados em Logaritmo Natural, observou-se diferença significativa entre os valores da CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) versus NHF ( $\mu\text{g/mL}$ ) e CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) versus ADP ( $\mu\text{g/mL}$ ) ( $p < 0,05$ ), como se pode observar na Figura 5. As médias dos valores da CIM foi de  $3,8 \mu\text{g/mL}$ , de NHF foi de  $61 \mu\text{g/mL}$  e da adaptação a valores superiores ao NHF foi de  $228,1 \mu\text{g/mL}$ , sendo uma diferença de 59,3 vezes nos valores das médias da adaptação a níveis superiores ao NHF em relação aos valores da CIM.



**Figura 10-** Violin-Plot: Comparação entre os valores da concentração inibitória mínima (CIM em µg/mL), nível de heterorresistência (NHF em µg/mL) e adaptação à níveis superiores ao NHF (ADP em µg/mL), dos isolados do Norte do Brasil, do complexo de espécies de *C. gattii/C. neoformans*, clínico e ambiental comparados por teste não paramétrico, Teste Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ), com os dados transformados para Logaritmo Natural. **CNA** – *Cryptococcus neoformans* ambiental, **CGA** – *Cryptococcus gattii* ambiental, **CNC** – *Cryptococcus neoformans* clínico, **CGC** – *Cryptococcus gattii* clínico.

#### 4 Discussão

Nos resultados do presente trabalho os isolados clínicos do complexo de *Cryptococcus gattii* apresentaram CIM superior aos isolados ambientais. Todos os isolados clínicos e ambientais demonstraram heterorresistência ao fluconazol e significativa parte apresentou valores de NHF superior a 16 µg/mL. No experimento de adaptação, significativa parte dos isolados foram capazes de apresentar crescimento em concentrações de fluconazol ainda maior que o NHF. Após nove repiques em meios de cultivo sem fluconazol, os fungos submetidos ao experimento de adaptação tiveram seu NHF reduzido, no entanto, no período, nenhum NHF retornou ao valor do NHF original. Esses resultados são importantes para a discussão sobre a relevância dos ensaios laboratoriais de determinação da CIM para fluconazol e apontam a possível importância da influência da heterorresistência na clínica médica.

Os isolados clínicos de *C. gattii* apresentaram CIM maior que os isolados ambientais, como observado por Feliciano et al. (2017). Mesmo sem informações clínicas sobre tratamento dos pacientes dos quais foram obtidos os isolados, pode-se inferir que esse fato pode ser devido



os isolados clínicos terem origem de pacientes sob terapia com fluconazol, muitas vezes por longos períodos de exposição ao azol, esse contato prévio pode ter induzido a uma CIM maior. Valores de 97,8 % dos isolados apresentaram valor de CIM < 16µg/mL. Valores de CIM < 16µg/mL frente fluconazol semelhantes (90%) foram observados por trabalhos previamente realizados no Amazonas, Rocha et al. (2018) e (81%) por Khell da Silva et al.(2012).

A heterorresistência foi observada em 100% dos isolados do complexo de espécies de *Cryptococcus neoformans/ Cryptococcus gattii*, independente da origem e da espécie, sendo cepa específico, reiterando a idéia da natureza intrínseca da heterorresistência. Esse resultado corrobora com outros estudos como Sionov et al. (2009); Varma e Kwon-Chung (2010) e Feliciano et al. (2017).

Quando comparamos os valores das médias de CIM e do NHF observamos valores de 3,8 e 61 µg/mL, respectivamente, observamos um aumento de 15,9 vezes nos valores de NHF. Esses achados demonstram a adaptação do complexo de espécies de *Cryptococcus neoformans/ Cryptococcus gattii* como mecanismo de sobrevivência ante o estresse à exposição crescente ao antifúngico e pode auxiliar na clínica, nos casos de ineficácia dos azois em tratamentos a longo prazo, como discutido por Sionov et al. (2009); Varma, Kwon-Chung (2010) e Feliciano et al. (2017).

No teste de determinação do nível de heterorresistência ao fluconazol, a frequência de células capazes de se adaptar ao NHF foi calculada pela contagem de UFC em meio ágar YPD isento de fluconazol, como controle positivo de crescimento e contagem em ágar YPD com FCL na concentração do NHF de cada isolado. A porcentagem foi obtida na relação UFC heterorresistentes/ UFC total. Esses valores variaram de 0,4 a 12,2 %, semelhante aos resultados encontrados em outros trabalhos. Na literatura encontramos no teste da heterorresistência o uso da concentração máxima de 128 µg/mL, mas devido o crescimento fúngico com frequência de heterorresistência alta em seis isolados, foi necessário a continuação do teste em concentrações de 256 e 512 µg/mL. Destacamos um isolado de *C. neoformans* clínico, que obteve percentual de 49% na concentração máxima de FCL (512 µg/mL) (FELICIANO et al.,2017; SIONOV et al.,2010; VARMA,KWON-CHUNG,2010). Observamos ambas as espécies apresentando alto nível de NHF ( $\geq 16$  µg/mL), apesar da tendência apontada por valor da média ser maior nos isolados de *C.gatti* clínico apresentando maior NHF do que *C. neoformans* clínico corroborando aos achados de Varma et al. (2010). Mais estudos com maior número de cada espécie são necessários para entender esta questão.

No ensaio adaptativo, quando comparamos os valores das médias dos valores de adaptação à níveis superiores ao NHF e valores das médias da concentração inibitória mínima

(CIM) observamos aumento de 158,1 vezes maior para isolados de *C. gattii* ambiental e 68 vezes para *C. neoformans* ambiental, 56,2 vezes para *C. neoformans* clínico e 49,9 vezes para *C. gattii* clínico. Isso demonstra a capacidade de adaptação de todos isolados frente a exposição a concentrações crescentes de fluconazol, conforme observado por Sionov et al. (2009) e por Feliciano et al. (2017). Observamos em significativa parte dos isolados subpopulações heterorresistente, que se adaptaram em concentrações superiores ao NHF, o limite analisado no estudo (512 µg/mL) é superior a dose plasmática máxima de fluconazol (próximo a 40 µg/mL), o que pode implicar na terapêutica (SANTOS et al., 2012).

No teste de estabilidade, durante nove transferências diárias em caldo YPD sem FCL, os 06 isolados, incluindo a cepa H99, nenhum reverteu ao NHF original. Todos isolados reduziram somente até 128 µg/mL, durante os nove repiques. Em dez dias de teste de estabilidade foram feitas 09 transferências em meio YPD, sem fluconazol. Observamos que os seis isolados cresceram nas concentrações de 16 a 128µg/mL, durante todo o teste, obtendo assim o NHF 128µg/mL. Essa “memória de resistência” ao fluconazol pode explicar o porquê dos isolados clínicos possuem maior CIM que os isolados ambientais, Complexo de *C.gattii*. Sendo essa mais uma evidência que a heterorresistência deve ser levada em consideração. A cepa de referência de heterorresistência, H99, foi usada em nosso estudo, obtivemos o nível de heterorresistência do FCL em 32 µg/mL e o nível de adaptação superior ao NHF até 128 µg/mL, assim como Sionov et al. (2009). No estudo de Yamazumi et al. (2003) houve reversão de dois isolados em 8 passagens, enquanto um isolado permaneceu altamente resistente em 13 passagens. Sionov et al. (2009) realizaram este teste em 45 dias com 04 isolados, todos reverteram à sua sensibilidade inicial em 3,16,26 e 45 transferências diárias para novo caldo YPD. Devido aos longos tratamentos a que são submetidos os pacientes com criptococose, o estudo da estabilidade da heterorresistência tem grande implicação na clínica médica.

Estudos tem sido realizados para explicar a fisiologia e bioquímica associada a heterorresistência de azóis frente a *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp.(MARR et al., 1998; MONDON et al., 1999; SIONOV et al., 2009). Estudos revelam associação entre alterações na heterorresistência com a plasticidade cromossômica e formação de aneuploidias em *C. neoformans* (CHANG et al., 2018). A duplicação dos cromossomos principalmente Chr1 e Chr4, parece estar relacionado com a resistência. Os genes ERG 11 e AFR1 estão associados ao Chr1 sendo o ERG 11 o alvo do FLC e o AFR1 o principal transportador de azóis em *C. neoformans*. Em 2010, Sionov demonstraram que a subpopulação altamente heterorresistente de *C. neoformans*, ao remover a pressão do medicamento, voltou ao seu nível original de suscetibilidade perdendo a cópia extra do cromossomo 1. O número de cromossomos dissômicos

mostrou estar diretamente associado a concentração de fluconazol suportado por cada isolado (SIONOV; CHANG; KWON-CHUNG, 2013). O mecanismo dessa plasticidade merece ser mais estudado com o objetivo de proporcionar novas estratégias ao controle da doença criptocócica.

Como limitação do presente estudo devemos citar o limitado número de isolados por grupo. São escassos os estudos sobre o mecanismo de adaptação do complexo de espécies *C. gattii* tendo em vista o número crescente de casos de criptococose causada por esse complexo de espécie, em todo o mundo, inclusive o Brasil (DAMASCENO-ESCOURA et al., 2019). Estudos com o número maior de amostras das duas espécies de origem clínica e ambiental é necessária para consolidar alguns pontos como a maior capacidade de resistência e adaptação do *C. gattii*. Tal entendimento seria benéfico para o estabelecimento de regimes terapêuticos e na previsão de desfechos clínicos com relação ao desenvolvimento de resistência e recidivas na criptococose causada por *C. gattii*.

Estudos clínicos futuros associando a avaliação do prognóstico dos pacientes acometidos por criptococose com testes de heterorresistência são necessários visto que os testes que determinam a concentração inibitória mínima dos isolados não são eficientes para detectar a porcentagem heterorresistente do complexo de espécies de *C. neoformans* /*C. gattii* capaz de se desenvolver em concentrações crescentes de fluconazol. Esses estudos devem definir o cut off para decisões de prática médica e darão subsídio para que os testes de heterorresistência após serem otimizados, façam parte da prática laboratorial dos laboratórios de referência, pois tem boa reprodutibilidade e são essenciais nas decisões clínicas. Estudos futuros como filogenia e heterorresistência frente a outros azóis mais potentes, como voriconazol, do isolado de *Cryptococcus neoformans* clínico que se adaptou em alta frequência (49%) na máxima concentração do estudo (512 µg/mL) podem ser relevantes para alertar e entender sobre a capacidade de resistência desse isolado em futuras infecções.

Ressaltamos a necessidade de estudos dos isolados do complexo de espécies de *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* da Região Norte do país relacionada a criptococose segundo a descoberta de Hagen et al. (2013) a origem do surto em Vancouver emergiu de uma população altamente recombinante de *C. gattii* na floresta nativa do Norte do Brasil, posteriormente dispersa para fora da área tropical original, chegando à América do Norte. Nossos achados avaliaram a sensibilidade frente ao FCL de isolados clínicos e ambientais do Norte do país e foram pioneiros na investigação do fenômeno da heterorresistência, enriquecendo a discussão sobre o assunto e fornecendo subsídios para estudos clínicos sobre prognóstico de evolução clínica na neurocriptococose. Observamos que os isolados clínicos do complexo de *Cryptococcus gattii* apresentaram CIM superior aos isolados ambientais. Todos os

isolados clínicos e ambientais demonstraram heterorresistência ao fluconazol e significativa parte apresentou valores de NHF superior a 16 µg/mL. No experimento de adaptação, significativa parte dos isolados foram capazes de apresentar crescimento em concentrações de fluconazol ainda maior que o NHF. Após nove repiques em meios de cultivo sem fluconazol, os fungos submetidos ao experimento de adaptação tiveram seu NHF reduzido, no entanto, no período, nenhum NHF retornou ao valor do NHF original. Os experimentos demonstraram que, em média, o valor do NHF dos isolados foi 15,9 vezes maior que a CIM original. Os experimentos demonstraram ainda que após o experimento de adaptação o valor do NHF foi 59,3 vezes maior que o valor da CIM original. Portanto, a maior parte dos isolados apresentaram valores de NHF muito superiores a 16 µg/mL. Esses resultados colocam em discussão a relevância clínica do ensaio de CIM e motivam o desenvolvimento de estudos *in vivo* para medir o impacto da heterorresistência no curso da criptococose.

## 5 Referências

- BAND, V. I.; WEISS, D. S. Heteroresistance: A cause of unexplained antibiotic treatment failure? **PLOSPathog**. 2019; 15: e1007726.
- CHANG, M. et al. Roles of three *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* efflux pump-coding genes in response to drug treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 4, 2018.
- CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 4th ed. CLSI standard M27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
- DAMASCENO-ESCOURA, A. H. et al. Epidemiological, Clinical and Outcome Aspects of Patients with Cryptococcosis Caused by *Cryptococcus gattii* from a Non-endemic Area of Brazil. **Mycopathologia**, v.184, p.65-71,2019.
- FELICIANO, L. M..Heteroresistance to Fluconazol in Clinical and Environmental Brazilian Strains of *Cryptococcus neoformans*/C. *gattii* Species Complex. **CurrFungalInfect Rep**. 2017;11(4):190–196.
- FERNANDO SILVA ROCHA, D. et al. MLST reveals a clonal population structure for *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI isolates from clinical sources in Amazonas, Northern-Brazil. **PLoS ONE**, v.13, n.6,p. e0197841, 2018.
- FERREIRA, G. F. et al..Heteroresistance to itraconazole alters the morphology and increases the virulence *Cryptococcus gattii*;**Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2015;59:4600-4609.
- GULLO, F. P. et al. Cryptococcosis: Epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. 2013; 32:1377-1391.

KHELL DA SILVA, B. et al. Characterization of clinical isolates of the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex from the Amazonas State in Brazil. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 29, n.1, p.40-43, 2012.

KWON-CHUNG, K. J. et al. The Case for Adopting the “Species Complex” Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **MSphere**,v.2; e00357-16, 2017

MARR, K. A. et al. Rapid, transient fluconazole resistance in *Candida albicans* is associated with increased mRNA levels of CDR. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**,v.42, n.10, p. 2584–2589, 1998.

MONDON, P. et al. Heteroresistance to fluconazole and voriconazole in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 43; p.1856-1861,1999

NYAZIKA, T. K. et al. Epidemiology and aetiologies of cryptococcal meningitis in Africa, 1950–2017: protocol for a systematic review. **BMJ Open**, v. 8; 2018.

PERFECT, J. R. et al.. The management of cryptococcal disease. **IDSA endorsed**, v.50; p. 291-322, 2010

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

SANTOS, S. et al. Monitoring amphotericin B and fluconazole concentrations in the plasma and cerebrospinal fluido f patients with cryptococcal meningitis. **Revista Portuguesa De Farmacoterapia**, v.4, n.4, p.15-18, 2012.

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

SIONOV, E. et al. *Cryptococcus neoformans* Overcomes Stress of Azole Drugs by Formation of Disomy in Specific Multiple Chromosomes. **PLOS Pathogens**, v. 6, n. 4, p. 1-13, 2010.

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

YAMAZUMI, T. et al. Characterization of heteroresistance to fluconazole among clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 267-272, 2003.

## 6 CONCLUSÃO

Nossos achados avaliaram a sensibilidade frente ao FCL de isolados clínicos e ambientais do Norte do país e foram pioneiros na investigação do fenômeno da heterorresistência, enriquecendo a discussão sobre o assunto e fornecendo subsídios para estudos clínicos sobre prognóstico de evolução clínica na neurocriptococose. Observamos que os isolados clínicos do complexo de *Cryptococcus gattii* apresentaram CIM superior aos isolados ambientais. Todos os isolados clínicos e ambientais demonstraram heterorresistência ao fluconazol e significativa

parte apresentou valores de NHF superior a 16 µg/mL. Observamos um isolado (3,7%) clínico de *C. neoformans* com alta frequência de heterorresistência, 49%. No experimento de adaptação, 100% dos isolados de *C.gattii* e 50% dos isolados de *C. neoformans* tiveram capacidade de adaptação. Já entre os isolados clínicos houve adaptação de 55,6 % dos isolados de *C.neoformans* e de *C.gattii*. Significativa parte dos isolados foram capazes de apresentar crescimento em concentrações de fluconazol ainda maior que o NHF. Após nove repiques em meios de cultivo sem fluconazol, os fungos submetidos ao experimento de adaptação tiveram seu NHF reduzido, no entanto, no período, nenhum NHF retornou ao valor do NHF original. Ressaltamos a relevância clínica da estabilidade da heterorresistência, os isolados adaptaram a concentrações superiores ao nível de heterorresistência e foram de difícil reversão, esse achado pode explicar as recaídas clínicas da doença, após a suspensão da terapia com fluconazol. Os experimentos demonstraram que, em média, o valor do NHF dos isolados foi 15,9 vezes maior que a CIM original. Os experimentos demonstraram ainda que após o experimento de adaptação o valor do NHF foi 59,3 vezes maior que o valor da CIM original. Portanto, a maior parte dos isolados apresentaram valores de NHF muito superiores a 16 µg/mL.

## 7 REFERÊNCIAS

- ALLER, A. I. et al. Correlation of fluconazole MICs with clinical outcome in cryptococcal infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, n. 6, p. 1544-1548, 2000.
- ALSPAUGH, J. A. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 55-58, 2015.
- ALSPAUGH, J. A.; DAVIDSON, R. C.; HEITMAN, J. Morphogenesis of *Cryptococcus neoformans*. **Dimorphism in Human Pathogenic and Apathogenic Yeasts**, p. 217-238, 2004.
- ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Antibiotic resistance and its cost: Is it possible to reverse resistance? **Nature Reviews Microbiology**, 2010.
- BAND, V. I.; WEISS, D. S. Heteroresistance: A cause of unexplained antibiotic treatment failure? **PLOSPathog**. 2019; 15: e1007726.
- BRAUNER, A. et al. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. **Nature Reviews Microbiology**, v.14, p.320-330, 2016.
- BRIZENDINE, K. D.; BADDLEY, J. W.; PAPPAS, P. G. Pulmonary cryptococcosis. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v.32, n. 6, p. 727-734, 2011.
- CHANG, M. et al. Roles of three *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* efflux pump-coding genes in response to drug treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 4, 2018.

- CHEONG, J. W. S.; MCCORMACK, J. Fluconazole resistance in cryptococcal disease: Emerging or intrinsic? **Medical Mycology**, 2013.
- CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 4th ed. CLSI standard M27. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2017.
- DAMASCENO-ESCOURA, A. H. et al. Epidemiological, Clinical and Outcome Aspects of Patients with Cryptococcosis Caused by *Cryptococcus gattii* from a Non-endemic Area of Brazil. **Mycopathologia**, v.184, p.65-71, 2019.
- DAMBUZA, I. M. et al. The *Cryptococcus neoformans* Titan cell is an inducible and regulated morphotype underlying pathogenesis. **PLoS Pathogens**, v. 14, n.4, 2018.
- DANNAOUI, E. et al. Results obtained with various antifungal susceptibility testing methods do not predict early clinical outcome in patients with cryptococcosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, n.7, p.2464-2470, 2006.
- DIAS, A. L. T. et al. Comparative analysis of Etest and broth microdilution method (AFST-EUCAST) for trends in antifungal drug susceptibility testing of Brazilian *Cryptococcus neoformans* isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, n. 12, p. 1693-1699, 2006.
- DROMER, F. et al. Determinants of disease presentation and outcome during cryptococcosis: The CryptoA/D study. **PLoS Medicine**, v. 4, n. 2, p. 297-308, 2007.
- EL-HALFAWY, O. M.; VALVANO, M. A. Antimicrobial heteroresistance: An emerging field in need of clarity. **Clinical Microbiology Reviews**, 2015.
- FELICIANO, L. M. et al. Heteroresistance to Fluconazole in Clinical and Environmental Brazilian Strains of *Cryptococcus neoformans*/C. *gattii* Species Complex. **Current Fungal Infection Reports**, v. 11, n.4, p. 190–196, 2017.
- FERNANDO SILVA ROCHA, D. et al. MLST reveals a clonal population structure for *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI isolates from clinical sources in Amazonas, Northern-Brazil. **PLoS ONE**, v.13, n.6,p. e0197841, 2018.
- FERREIRA, G. F. et al. Heteroresistance to itraconazole alters the morphology and increases the virulence of *Cryptococcus gattii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n.8, p. 4600-4609, 2015.
- FERREIRA, G. F.; SANTOS, D. A. Heteroresistance and fungi. **Mycoses**, 2017.
- FIRACATIVE, C. et al. The status of cryptococcosis in Latin America. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2018.
- FRANZOT, S. P.; SALKIN, I. F.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: Separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n.3, p. 838-840, 1999.
- FREIRE, A. K. L. et al. Molecular characterisation of the causative agents of Cryptococcosis in patients of a tertiary healthcare facility in the state of Amazonas-Brazil. **Mycoses**, v.55, n.3, 2012.
- GOVENDER, N. P. Cryptococcosis in apparently immune-competent patients: taxonomy, epidemiology, pathophysiology and treatment AU - Wake, Rachel. **Southern African Journal of Infectious Diseases**, v. 31, n.2, p. 32–34, 9 jun. 2016.

- GRAYBILL, J. R. et al. Treatment of murine cryptococcosis with liposome-associated amphotericin b. **Journal of Infectious Diseases**, v.145, n.5, p.748-752, 1982.
- GULLO, F. P. et al. Cryptococcosis: Epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.32, n.11, p.1377-1391, 2013.
- HADDOW, L. J. et al. Cryptococcal immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV-1-infected individuals: proposed clinical case definitions. **The Lancet Infectious Diseases**, 2010.
- HAGEN, F. et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genetics and Biology**, v.78, p. 16-48, 2015.
- HAGEN, F. et al. Ancient Dispersal of the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus gattii* from the Amazon Rainforest. **PLoS ONE**, v.8, n. 8, p. e71148, 2013.
- JARVIS, J. N. et al. Adult meningitis in a setting of high HIV and TB prevalence: Findings from 4961 suspected cases. **BMC Infectious Diseases**, 2010.
- KHELL DA SILVA, B. et al. Characterization of clinical isolates of the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex from the Amazonas State in Brazil. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 29, n.1, p.40-43, 2012.
- KIDD, S. E. et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.101, n.49, p. 17258-17263, 2004.
- KON, A. S. et al. Guidelines in cryptococcosis – 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2008.
- KWON-CHUNG, K. J. et al. The Case for Adopting the “Species Complex” Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **mSphere**, v. 2, n. 1, 2017.
- KWON-CHUNG, K. J.; VARMA, A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? **FEMS Yeast Research**, 2006.
- MARCOS, J. Y.; PINCUS, D. H. Fungal diagnostics: Review of commercially available methods. **Methods in Molecular Biology**, 2013.
- MARR, K. A. et al. Rapid, transient fluconazole resistance in *Candida albicans* is associated with increased mRNA levels of CDR. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.42, n.10, p. 2584–2589, 1998.
- MAY, R. C. et al. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, p. 106, 21 dez. 2015.
- MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. *Cryptococcosis*. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.30, n.1, p. 179–206, 2016.
- MEYER, W. et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Medical Mycology**, 2009.
- MEYER, W. et al. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA - A pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. **Electrophoresis**, v.20, n. 8, p. 1790-1799, 1999.



- MEYER, W. et al. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n.2, p.189-195, 2003.
- MONDON, P. et al. A novel episomal shuttle vector for transformation of *Cryptococcus neoformans* with the *ccdB* gene as a positive selection marker in bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v.187, n.1, p.41-45, 2000.
- MONDON, P. et al. Heteroresistance to fluconazole and voriconazole in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, n.8, p.1856-1861, 1999.
- MPOZA, E.; RHEIN, J.; ABASSI, M. Emerging fluconazole resistance: Implications for the management of cryptococcal meningitis. **Medical Mycology Case Reports**, v.19, p.30-32, 2018.
- MUKAREMERA, L. et al. Titan cell production in *Cryptococcus neoformans* reshapes the cell wall and capsule composition during infection. **The Cell Surface**, v.1, p.15-24, 2018.
- NADAL, S. R.; MANZIONE, C. R. Síndrome Inflamatória da Reconstituição Imunológica. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v.29, p.125-128, 2009.
- NYAZIKA, T. K. et al. Epidemiology and aetiologies of cryptococcal meningitis in Africa, 1950–2017: protocol for a systematic review. **BMJ Open**, v.8, n. 7, 2018.
- PAPPAS, P. G. et al. Cryptococcosis in Human Immunodeficiency Virus–Negative Patients in the Era of Effective Azole Therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v.33, n.5, p.690-699, 2002.
- PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*: A sugar-coated killer with designer genes. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.45, n. 3, p.395-404, 2005.
- PERFECT, J. R. et al. Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n.3, p 291-322, 2010.
- PERFECT, J. R.; BICANIC, T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 49–54, 2015.
- PERFECT, J. R.; CASADEVALL, A. Cryptococcosis. **Infectious disease clinics of North America**, v.16, n.4, p.837-874, 2002.
- RAJASINGHAM, R. et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. 873-881, 2017.
- ROSSI, S. A. et al. Impact of resistance to fluconazole on virulence and morphological aspects of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates. **Frontiers in Microbiology**, 2016.
- SANGUINETTI, M. et al. Role of *AFR1*, an ABC transporter-encoding gene, in the in vivo response to fluconazole and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v.74, n.2, p.1352-1359, 2006
- SANTOS, J. R. A. et al. Fluconazole alters the polysaccharide capsule of *cryptococcus gattii* and leads to distinct behaviors in murine cryptococcosis. **PLoS ONE**, v.9, n. 11, 2014.
- SAWADOGO, S. et al. Estimated prevalence of *Cryptococcus antigenemia* (CrAg) among HIV-infected adults with advanced immunosuppression in Namibia justifies routine screening and preemptive treatment. **PLoS ONE**, v.11, n. 10, 2016.

- SIDRIM JJC, Rocha MFG. *Micologia Médica à luz de autores contemporâneas*. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2004.
- SIONOV, E. et al. Cryptococcus neoformans Overcomes Stress of Azole Drugs by Formation of Disomy in Specific Multiple Chromosomes. *PLOS Pathogens*, v. 6, n. 4, p. 1-13, 2010.
- SIONOV, E. et al. Heteroresistance to fluconazole in Cryptococcus neoformans is intrinsic and associated with virulence. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 53, n. 7, p. 2804-2815, 2009
- SMITH, K. D. et al. Increased Antifungal Drug Resistance in Clinical Isolates of Cryptococcus neoformans in Uganda. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.59, n. 12, p. 7197-7204, 2015.
- SMITH, R. M. et al. Treatment and outcomes among patients with Cryptococcus gattii infections in the United States Pacific Northwest. *PLoS ONE*, v.9, n. 2, 2014.
- SOARES, E. A. **Mortalidade por criptococose no Brasil (2000 a 2012)**. 2015. Dissertação (Mestrado modalidade profissional em Epidemiologia em Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Osvaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- SOUZA, S. L. S. et al. Causes of death among patients with acquired immunodeficiency syndrome autopsied at the Tropical Medicine Foundation of Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. 3, p. 247–251, 2008.
- STONE, N. R. H. et al. Dynamic ploidy changes drive fluconazole resistance in human cryptococcal meningitis. *Journal of Clinical Investigation*, v.129, n. 3, p. 999-1014, 2019.
- THOMPSON, G. R. et al. Isavuconazole Treatment of Cryptococcosis and Dimorphic Mycoses. *Clinical Infectious Diseases*, 2016.
- TRILLES, L. et al. Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the Cryptococcus neoformans/C. gattii species complex. *Medical Mycology*, v.50, n.3, p. 328-332, 2012.
- TUCKER, S. C.; CASADEVALL, A. Replication of Cryptococcus neoformans in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.99, n. 5, p. 3165-3170, 2002.
- VARMA, A.; KWON-CHUNG, K. J. Heteroresistance of Cryptococcus gattii to fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, n. 6, p. 2303-2311, 2010.
- WANG, H. et al. The efficacy of self-assembled cationic antimicrobial peptide nanoparticles against Cryptococcus neoformans for the treatment of meningitis. *Biomaterials*, v. 31, n.10, p. 2874-2881, 2010.
- WARKENTIEN, T.; CRUM-CIANFLONE, N. F. An update on Cryptococcus among HIV-infected patients. *International Journal of STD and AIDS*, v. 21, n. 10, p. 679-684, 2010.
- YAMAZUMI, T. et al. Characterization of heteroresistance to fluconazole among clinical isolates of Cryptococcus neoformans. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 1, p. 267-272, 2003.
- YAO, Y. et al. Voriconazole: A novel treatment option for cryptococcal meningitis. *Infectious Diseases*, v. 47, n. 10, p. 694- 700, 2015