

Distribuição de tipos moleculares de *Cryptococcus gattii* no Brasil: uma revisão bibliográfica

Distribution of *Cryptococcus gattii* molecular types in Brazil: a bibliographic review

RESUMO

Joaquim Lucas Júnior¹
Isabele Barbieri dos Santos¹
Vitor Laerte Pinto Júnior¹
André Moraes Nicola²

Objetivo: Descrever a distribuição molecular do *Cryptococcus gattii* no Brasil por meio de revisão de estudos publicados até 2016.

Fonte de dados: Revisão bibliográfica de estudos publicados até 2016 no sítio DeCS-BVS com os descritores nos idiomas português, Inglês e espanhol. O critério de inclusão foi: abordar resultados de caracterização molecular de *C. gattii* no Brasil. Critérios de exclusão: artigos sem texto completo e artigos sem informações moleculares de *C. gattii*.

Síntese de dados: Inclui-se dez publicações entre 2008 e 2016 que contêm informações sobre a caracterização molecular de *C. gattii* de isolados encontrados nas quatro regiões do Brasil.

Conclusões: *C. gattii* é endêmico nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, mas pode ser encontrado em fontes primárias nas demais regiões. O tipo molecular mais predominante foi o VGII, responsável por cerca de 80% dos casos. VGII apresentou uma alta variabilidade genética. O VGII encontrado na região Nordeste é diferente do encontrado na região Norte.

Palavras-chave: *Cryptococcus gattii*; *Cryptococcus*; Criptococose.

¹Programa de Epidemiologia e Vigilância em Saúde – PEPIVS da Fiocruz Brasília

²Professor da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – UnB

Correspondência

Programa de Epidemiologia e Vigilância em Saúde – PEPIVS

Avenida L3 Norte, s/n, Campus
Universitário Darcy Ribeiro, Gleba A -
Bloco Administrativo – Primeiro Andar -
CEP: 70910-900 - Brasília – DF

E-mail: joaquim.junior@fiocruz.br

ABSTRACT

Objective: Describe the distribution of *Cryptococcus gattii* molecular types in Brazil by reviewing studies published until 2016.

Source of data: Review of studies published until 2016 in the DeCS-BVS site in Portuguese, English or Spanish. The inclusion criterion was description of molecular typing of *C. gattii* isolates obtained in Brazil. Manuscripts without full text and without molecular information on *C. gattii* were excluded.

Synthesis of the collected data: We have included ten publications ranging from 2008 to 2016 containing information about the molecular characterization of *C. gattii* isolates from the four geographic regions of Brazil.

Conclusions: *C. gattii* is endemic in the North and Northeast regions of Brazil, but can also be found in the other regions. The predominant molecular type was VGII, accounting for about 80% of the cases. VGII has very high genetic variability. VGII isolates from the Northeast region are distinct from those found in the North.

Keywords: *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus*, cryptococcosis,

INTRODUÇÃO

A criptococose é uma micose sistêmica emergente e cosmopolita com alta letalidade, responsável por cerca de 625 mil mortes por ano em todo o mundo¹. É causada por fungos do gênero *Cryptococcus*, e atinge mais frequentemente pacientes imunocomprometidos (HIV/AIDS), mas também imunocompetentes². Esses fungos podem ser adquiridos na infância e ficar adormecidos por décadas até que o sistema imunológico do paciente sofra supressão e a infecção prospere³.

Tradicionalmente se consideram de importância médica somente as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*. Essas podem ser diferenciadas por téc-

nicas microbiológicas, sorológicas e moleculares. O método microbiológico tradicional mais usado é o meio canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB), meio em que *C. gattii* degrada creatina em amônia e leva a alcalinização e mudança de cor. Reagentes sorológicos baseados em anticorpos policlonais de coelho permitem diferenciar as espécies de interesse médico em sorotipos A, D e AD (*C. neoformans*) e B e C (*C. gattii*)⁴. Essas duas estratégias tradicionais de classificação têm limitações severas por não diferenciarem entre subtipos epidemiológica e clinicamente distintos e também por dependerem de reagentes não disponíveis mais comercialmente.

Ao longo das duas últimas décadas, foram então substituídas por métodos moleculares, que permitem uma caracterização muito mais precisa dos isolados. Dentre eles, quatro apresentam resultados correspondentes: 1- PCR – fingerprinting (PCR – m13)⁵; 2- RFLP (restriction fragment length polymorphism) do gene URA5⁶; 3- AFLP (amplified fragment length polymorphism)⁷; e 4- MLST (multi-locus sequence typing) para a amplificação dos genes URA5, CAP59, GPD1, LAC1, PLB1, e região IGS1⁸.

Hagen et al. (2015)⁹, a partir de dados de filogenia molecular, sugeriram que as diferenças genéticas são tão importantes que *C. neoformans* seja dividida em duas espécies - *C. neoformans* e *C. deneoformans* - e que *C. gattii* seja dividida em cinco espécies - *C. gattii*, *C. bacillisporus*, *C. deuterogattii*, *C. tetragattii* e *C. decagattii*. Uma clara definição filogenética favorecerá, ao longo do tempo, que espécies mais virulentas sejam identificadas mais rapidamente, melhorando o prognóstico e a eficácia do tratamento.

Quadro 01

Nomenclaturas moleculares das principais espécies patogênicas do gênero <i>Cryptococcus</i> .				
AFLP ¹	MLST ²	Sorotipo	Espécie (sensu latu) ³	Espécie (sensu strictu) ⁴
AFLP-1	VNI	A	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	<i>C. neoformans</i>
AFLP-1A e 1B	VNII	A	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	<i>C. neoformans</i>
AFLP-3	VNIII	AD	<i>C. neoformans</i> intervariety hybrid	<i>C. deneoformans</i> hybrid
AFLP-2	VNIV	D	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	<i>C. deneoformans</i>
AFLP-4	VGI	B	<i>Cryptococcus gattii</i>	<i>Cryptococcus gattii</i>
AFLP-6	VGII	B	<i>Cryptococcus gattii</i>	<i>Cryptococcus deuterogattii</i>
AFLP-5	VGIII	B	<i>Cryptococcus gattii</i>	<i>Cryptococcus Bacillisporus</i>
AFLP-7	VGIV	C	<i>Cryptococcus gattii</i>	<i>Cryptococcus tetragattii</i>
AFLP-10	VGIV/VGIIC	C	<i>Cryptococcus gattii</i>	<i>Cryptococcus decagattii</i>

Adaptado de Hagen et al, (2015)⁹ e Meyer et al, 2011¹⁰

¹Amplified fragment length polymorphism.

²Multilocus sequence typing.

³Definição de espécie anterior à proposta por Hagen et al, (2015)⁹. São consideradas somente duas espécies no complexo *C. neoformans* / *C. gattii*.

⁴Definição de espécie proposta por Hagen et al, (2015)⁹.

Para facilitar a compreensão, neste trabalho, usaremos a nomenclatura tradicional que mantém o conceito de duas espécies *C. neoformans* e *C. gattii* e seus tipos moleculares, pelo método MLST de Meyer et al, (2009)⁸. Nesta classificação as duas espécies definidas mais amplamente (sensu latu) são separadas em dois grupos, ambas com quatro genótipos distintos: *C. neoformans*: VNI-VNIV; e *C. gattii*: VGI-VGIV. E ainda usaremos a subdivisão do VGII em três genótipos: VGIIa, VGIIb e VGIIc.

A criptococose causada por *C. gattii* é endêmica nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, apresentando forte associação com SNC em adultos jovens e crianças¹¹. Casos de *C. gattii* encontrados nas demais regiões do país, frequentemente são em pessoas oriundas das regiões endêmicas. Para o profissional que lida com os pacientes, o diag-

nóstico da criptococose causada por *C. gattii* é desafiador por ocorrer em pessoas frequentemente imunocompetentes e em faixas etárias distintas do jovem adulto que normalmente desenvolve criptococose associada à AIDS. Portanto, a caracterização molecular do agente em distintas regiões geográficas do Brasil pode favorecer tanto o trabalho de profissionais que lidam diretamente com os pacientes quanto a melhoria nas políticas públicas de saúde para o enfrentamento da doença. Tendo isso em mente, o objetivo da presente revisão é sumarizar estudos, publicados até 2016, de caracterização molecular de *C. gattii* no Brasil.

METODOLOGIA

Tratou-se de uma Revisão bibliográfica com pesquisa no sítio DeCS-BVS com os descritores: criptococose, cryptococcosis, critococosis e cryptococcus.

Foram encontrados 6.380 artigos assim distribuídos: 376 no LILACS, 5.904 no MEDLINE, 37 no ADOLEC, 03 no MedCarib e 70 no IBECs. Com a palavra Brasil/Brasil minimizou-se para 207, e com mais um refinamento pelo termo *Cryptococcus gattii*, restaram 30 artigos, dentre eles, 10 artigos continham as informações objeto desta revisão.

Os critérios de exclusão foram: artigos sem texto completo, artigos sem informações moleculares do *Cryptococcus gattii*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram utilizadas dez publicações entre 2008 e 2016 que contêm informações sobre a caracterização molecular de isolados de *C. gattii* obtidos no Brasil, conforme sistematizado no quadro 2.

Quadro 2

Caracterização Molecular de *Cryptococcus gattii* em 10 estudos realizados no Brasil entre 2008 e 2016.

Estudo	Nº Isolados/local	Método	Achados Moleculares	Conclusões dos autores
Santo et al. (2008) ¹²	56 isolados Belém-PA 2003-2007	PCR-fingerprinting e URA5- RFLP	HIV(-): Cg 19 (65,5%). HIV(+): Cg 2 (14,3%); Cg VGI 3 (5,4%). Cg VGII 25 (44,6%).	- Cg foi o principal agente causador de meningite nos pacientes HIV-negativos e ocorreu também em dois pacientes HIV-positivos. - Alta frequência de meningite criptocócica em crianças HIV-negativas. - VGII foi o principal agente causador em casos de <i>C. gattii</i> .
Trilles et al. (2008) ¹¹	443 isolados de todas as regiões brasileiras.	URA5 -RFLP e PCR-fingerprinting microssatélites fago M13	123 Cg = 84 humanos, 02 animais e 37 ambientais VGII 21%; VGIII 4%; VGI 3%; VGIV 0.	- Cg predominou na macro região norte - VGII é endêmico nesta região, onde é responsável por 89% das infecções por Cg e 36/37 isolados ambientais no NM. - VGII na macro-região sul é 43% das infecções por Cg
Costa SPSE (2008) ¹³	220 isolados ambientais Hospital João de Barros Barretos – Belém-PA - 2004-2005	PCR – RFLP do gene URA5	Cg VGIII foi encontrado em ocos de árvores	- Cg foi encontrado em poeira domiciliar; - Cn VNI e Cg VGII compartilharam o mesmo nicho em um oco vegetal;
Luvizotto et al. (2009) ¹⁴	01 isolado de 01 bode - Hospital de Ensino da UNESP Araçatuba- SP	Multiplex-PCR Com MVA 009 (ATCC 24066)	Tecido cerebral e pulmonar: 1 Cg VGIV	Múltiplas lesões cerebrais e um grande nódulo pulmonar -Primeiro caso de Cg em caprinos no Brasil.
Costa et al. (2009) ¹⁵	07 amostras de madeira e 04 de fezes de pombos em Belém-PA	URA5-RFLP Cn VNI-VNIV Cg VGI-VGIV	Madeira: 1Cg VGII	- A detecção do tipo Cg VGII em uma cavidade de uma árvore na cidade de Belém reforça que este tipo molecular merece maior atenção em outras partes da Amazônia brasileira, bem como em outros países da América do Sul
Pinto Júnior et al, (2010) ¹⁶	1 isolado no Instituto Fernandes Figueira em 2005	URA5 -RFLP, de acordo com a Meyer et al, 2003. Padrões de RFLP com estirpes de referência.	Cg VGII	- Criança autóctone do Rio de Janeiro sem histórico de viagens às regiões endêmicas; - Pode estar havendo uma disseminação da doença em regiões não endêmicas.

<p>Martins et al. (2011)¹⁷</p>	<p>63 isolados do PI, MA e PA Instituto de Doenças Tropicais Teresina-PI 2008-2010</p>	<p>Genotipagem por análise URA5-RFLP com cepas de referência para Cg: VGI, VGII, VGIII e VGIV.</p>	<p>Cg VGII 24 (38,1%). Dos 37 HIV(+): Cg VGII 3 (8,1%) Cg VGI 1 (2,7%) Dos 26 HIV(-): Cg VGII 21 (80,8%).</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 37,4% dos pacientes Cg morreram; - 01 paciente com Cg VGI no Pará, caso raro no país, mais comum no Canadá e Países Baixos. - Cg são isolados com frequência de ocas de árvores no Piauí. A região tem as condições necessárias para albergar ambas as espécies. - A distribuição de Cg pode ser muito mais ampla do que documentado atualmente.
<p>Souza et al. (2013)¹⁸</p>	<p>71 isolados de 62 do hospital de Doenças Tropicais de Goiás: 2009-2010</p>	<p>Oligonucleótidos de sequência específica minissatélite de fago M13 e da sequência específica do microssatélite (GACA) 4 como iniciadores únicos nas reações de PCR-fingerprinting</p>	<p>4 Cg-VGII (5,6%).</p>	<ul style="list-style-type: none"> - A baixa taxa de Cg obtida em nosso estudo pode ter ocorrido porque esta espécie não é endêmica em Goiás. Em 290 amostras ambientais recolhidas a partir de fezes de pombos e materiais associados com as árvores de eucalipto de Goiânia-GO, Kobayashi et al, 2005 encontrou 41 <i>Cryptococcus</i>, os quais todos foram identificados como <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>. Sorotipo A.
<p>Souto ACP (2013)¹⁹</p>	<p>111 isolados da Coleção de Fungos Patogênicos (CFP) do IPEC/FIOCRUZ existente desde 1980 e de isolados enviados do Piauí</p>	<p>Tipagem molecular. MLST de 06 genes de virulência (CAP59, GPD1, LAC1, PLB1, SOD1 e URA5) e da região IGS.</p>	<p>85 VGII. 47 STs descritos somente no Brasil. ST20 (VGIIa) foi o mais frequente. ST5 (VGIIb) foi o segundo mais frequente. VGIIc não foi encontrado no estudo. 26 VGI não foi objeto do estudo. VGIII: não foi encontrado. VGIV: não foi encontrado.</p>	<p>As cepas <i>C. gattii</i> VGII brasileiras estudadas apresentam uma alta variabilidade genética, sendo a maior até agora registrada em estudos mundiais similares;</p> <ul style="list-style-type: none"> - Os subtipos VGIIa e VGIIb, relacionados à epidemia em Vancouver, foram identificados na região norte do Brasil, mas não nas demais regiões brasileiras, indicando um perfil regional peculiar, vinculado à Amazonia; - A subpopulação de VGII analisada na região NE, característica do semiárido, mostrou-se distinta da região N e demais regiões brasileiras; - A hipótese de que a epidemia de Vancouver é proveniente de uma população altamente recombinante de <i>C. gattii</i> VGII originária do Norte do Brasil e, a partir desta região amazônica, linhagens recombinantes teriam se dispersado para áreas temperadas causando infecções em humanos e animais susceptíveis foi reforçada com os resultados deste estudo mostrando a presença dos subtipos VGIIa e VGIIb.
<p>Souto et al, (2016)²⁰</p>	<p>187 isolados clínicos e ambientais de Cg VGII. Sendo 145 Coleção de Fungos Patogênicos (CFP) do IPEC/FIOCRUZ existente desde 1980 e 42 STs publicadas no Brasil e outros países</p>	<p>Tipagem molecular. MLST de 06 genes de virulência (CAP59, GPD1, LAC1, PLB1, SOD1 e URA5) e da região IGS. Filogenia para comparar as populações brasileiras com os outras estudadas</p>	<p>81 MLST. 02 grupos principais de VGII: VGIIa (ST20) e VGIIb (ST7). Apenas 01 VGIIc (ST272). Subtipos mais frequentes: ST40; ST20 s ST5</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Elevada variabilidade genética entre VGII. Todas as regiões brasileiras apresentaram alta diversidade de haplótipos, com a maior encontrada na região Nordeste - Acontecem eventos de recombinação na população VGII brasileira explicando a alta diversidade. - VGIIa - importante no surto em Vancouver e VGIIb - presente no surto de Vancouver foram encontrados no norte do Brasil - A detecção de alta diversidade genética entre VGII pode dar origem a cepas altamente virulentas nas regiões N e NE do Brasil - VGII é um patógeno multi-hospedeiro, sobrevivendo e se adaptando a novos habitats

Fonte: Quadro construído a partir de informações do LILACS. Uma primeira informação importante que esses trabalhos mostram é que a distribuição geográfica de espécies e tipos moleculares do gênero *Cryptococcus* no Brasil é bastante distinta. Nas regiões Norte e Nordeste, uma grande proporção dos pacientes com criptococose é infectada por *C. gattii*, enquanto nas regiões Sul e Sudeste a maior parte é de *C. neoformans*. Dentre os isolados de *C. gattii*, o tipo molecular mais comum foi o VGII. Este tipo corresponde a 76,5% dos 111 isolados de *C. gattii* de todo o Brasil tipados por Souto (2013)¹⁹. Essa proporção é ainda maior na macrorregião Norte do Brasil (89%), ficando em torno de 40% na macrorregião Sul¹¹. Apesar de ser mais frequente nas regiões Norte e Nordeste, *C. gattii* também pode ser encontrado mais ao Sul do Brasil tanto em imigrantes quanto em casos autóctones, sem nenhuma evidência de viagem às regiões onde esta espécie é endêmica¹⁶.

Além de isolados clínicos, vários estudos também tiparam molecularmente isolados de *C. gattii* obtidos de animais e de fontes ambientais. Baltazar e Ribeiro (2008)²¹ encontraram dois isolados de *C. gattii* em árvores de floresta atlântica no norte do Espírito Santo; Costa (2008)¹³ analisou 220 isolados ambientais, coletados entre 2004 e 2005 em Belém do Pará, encontrando *C. gattii* em poeira domiciliar e em ocos de árvores. Encontrou também, em um mesmo oco de árvore *C. neoformans* VNI e *C. gattii* VGII partilhando do mesmo nicho. Cogliati (2013)²² também encontrou o compartilhamento de nicho ecológico entre *C. neoformans* e *C. gattii* em amostras de madeira em decomposição e solo. A forte associação de *C. gattii* com árvores e material vegetal em decomposição pode ser bastante útil para profissionais que lidam com o diagnóstico clínico da criptococose.

A criptococose é fortemente associada à pandemia de AIDS, acometendo na maioria das vezes homens jovens HIV-positivos com contagem de linfócitos CD⁴ bastante reduzida. A criptococose causada por *C. gattii*, entretanto, é bastante diferente clinicamente e epidemiologicamente²³. Talvez o exemplo mais estudado seja o do surto de *C. gattii* na costa oeste do Canadá e Estados Unidos, com mais de uma centena de casos registrados ao longo dos últimos 15 anos²⁴. Frequentemente esses casos ocorrem em pessoas imunocompetentes; crianças e adultos são bastante afetados, em contraste com a distribuição etária de casos de meningoencefalite por *C. neoformans* associada à AIDS; manifestações fora do sistema nervoso central, como pneumonia, também são bem mais frequentes com *C. gattii*²³. Estas diferenças dificultam bastante o diagnóstico clínico da criptococose causada por *C. gattii*.

CONCLUSÃO

C. gattii é endêmico nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, mas pode ser encontrado em fontes primárias nas demais regiões. O tipo molecular mais predominante no Brasil é o VGII, responsável por cerca de 80% dos casos, apresentando uma alta variabilidade genética. Como *C. gattii* frequentemente causa doença grave em pessoas aparentemente imunocompetentes e em idades não comumente associadas a alto risco de AIDS, profissionais de saúde devem manter um grau de suspeição e solicitar exames diagnósticos específicos para criptococose em casos de meningoencefalite e pneumonia mesmo em pacientes em que a possibilidade de infecção pelo HIV seja remota. Gestores de sistemas de saúde também devem levar em consideração a existência deste patógeno negligenciado no Brasil, a fim de prover aos profissionais de laboratórios clínicos e de saúde a infraestrutura necessária para diagnóstico em tempo adequado e tratamento antifúngico.

REFERÊNCIAS

- Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *SIDA*. 2009; 23: 525-530.
- Brouwer AE, Rajanuwong A, Chierakul W, Griffin GE, Larsen RA, White NJ, et al. (2004) Combination antifungal therapies for HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomised trial. *Lancet* 363: 1764-1767. PMID:15172774 doi: 10.1016/s0140-6736(04)16301-0
- Kronstad JW, Attarian R, Cadieux B, Choi J, D'Souza CA, Griffiths EJ, Geddes JM, Hu G, Jung WH, Kretschmer M, Saikia S, Wang J. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat Rev Microbiol*. 2011 Mar;9(3):193-203.
- Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennet JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotype B and C). *Journal Clinical Microbiology* 115:535-537, 1982.
- Meyer W, Marszewska K, Amirmostofian M, et al. (1999) 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* 20: 1790-1799
- Meyer W, Castaneda A, Jackson S, Huynh M, Castaneda E and the Ibero American Cryptococcal Study Group (2003): Molecular typing of Ibero American *Cryptococcus neoformans* Isolates, *Emerging Infect. Dis.*: 9(2):189-195. 44
- Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WCJ, Abeln ECA, Dromer F, Meyer W. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*.2001; 147:891-907
- Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposto MC, et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol*. 2009; 47:561-570.
- Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Kolecka A, Polacheck I, et al. (2015) Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol*. doi: 10.1016/j.fgb.2015.02.009
- Meyer W, Gilgado F, Ngamskulrungron P, Trilles L, Hagen F, Castañeda E et al. Molecular typing of *Cryptococcus*. In *Cryptococcus: from human pathogen to model yeast*. ASM Press. 2011. p. 327-358.
- Trilles L, Lazéra MS, Wanke B, Oliveira RV, Barbosa GG, Nishikawa MM et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [Internet]. 2008 Aug [cited 2016 Aug 15]; 103(5): 455-462.
- Santos WRA, Meyer W, Wanke B, Costa SPSE, Trilles L, Nascimento JLM et al. Primary endemic *Cryptococcosis gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [Internet]. 2008 Dec [cited 2016 Aug 15]; 103(8): 813-818.
- Costa, SPSE. Isolamento e caracterização molecular de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* de fontes ambientais na região metropolitana de Belém, Pará / Solange do Perpétuo Socorro Evangelista Costa. – Rio de Janeiro, 2008. xviii, 161 f. : il. ; 30 cm. Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2008.
- Luvizotto MCR, Carreira VS, Ferrari HF, Ribeiro D, Vallim MA, Azevedo V et al. Brain and lung cryptococcoma and concurrent corynebacterium pseudotuberculosis infection in a goat: a case report. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis* [Internet]. 2009 [cited 2016 Aug 15] ; 15(3): 553-561.
- Costa SPSE, Lazéra MS, Santos WRA, Morales BP, Bezerra CCF, Nishikawa MM et al. First isolation of *Cryptococcus gattii* molecular type VGII and *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI from environmental sources in the city of Belém, Pará, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [Internet]. 2009 July [cited 2016 Aug 15] ; 104(4): 662-664.
- Pinto Junior V L, Pone MVSilva, Pone SM, Campos JMS, Garrido JRP, Barros ACMW et al. *Cryptococcus gattii* molecular type VGII as agent of meningitis in a healthy child in Rio de Janeiro, Brazil: report of an autochthonous case. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* [Internet]. 2010 Dec [cited 2016 Aug 15] ; 43 (6): 746-748.

17. Martins LMS, Wanke B, Lazéra MS, Trilles L, Barbosa GG, Macedo RCL de et al. Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piauí (northeastern Brazil). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [Internet]. 2011 Sep [cited 2016 Aug 15]; 106(6): 725-730.
 18. Souza LKH, Costa CR, Fernandes OFL, Abrao FY, Silva TC, Tremea CMartins et al. Clinical and microbiological features of cryptococcal meningitis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* [Internet]. 2013 June [cited 2016 Aug 15]; 46(3): 343-347.
 19. Souto, ACP. Analysis of the Variability of VGII genotype of *Cryptococcus gattii* in Environmental and Clinical Isolates from Brazil. Rio de Janeiro, 2013. 80f. Master [Science dissertation in Clinic Research in Infectious Diseases] - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.
 20. Souto ACP, Bonfietti LX, Ferreira-Paim K, Trilles L, Martins M, Ribeiro-Alves M, et al. (2016) Population Genetic Analysis Reveals a High Genetic Diversity in the Brazilian *Cryptococcus gattii* VGII Population and Shifts the Global Origin from the Amazon Rainforest to the Semi-arid Desert in the Northeast of Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 10(8)
 21. Baltazar LM, Ribeiro MA. Primeiro isolamento ambiental de *Cryptococcus gattii* no Estado do Espírito Santo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* [Internet]. 2008 Oct [cited 2016 Aug 15]; 41(5): 449-453.
 22. Cogliati M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. *Scientifica*. 2013; 2013: 1-23.
 23. Chen SC, Meyer W, Sorrell TC. *Cryptococcus gattii* infections. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27: 980–1024. doi: 10.1128/CMR.00126-13. pmid:25278580.
 24. Espinel-Ingroff A, Kidd SE. 2015. Current trends in the prevalence of *Cryptococcus gattii* in the United States and Canada. *Infect Drug Resist* 8:89–97.10.2147/IDR.S57686.
-