



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

TALITA DE JESUS CALDAS NUNES

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE SOROTIPOS E
DETERMINAÇÃO DE *MATING TYPE* DE ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Cryptococcus* spp.**

SALVADOR-BA

2013

TALITA DE JESUS CALDAS NUNES

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE SOROTIPOS E
DETERMINAÇÃO DE *MATING-TYPE* DE ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Cryptococcus* spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dra. Tânia F. Barros.

SALVADOR-BA

2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde,
SIBI - UFBA.

N972 Nunes, Talita de Jesus Caldas

Identificação molecular de sorotipos e determinação de mating type de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp / Talita de Jesus Caldas Nunes. – Salvador, 2013.

68 f.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª Tânia Fraga Barros

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Ciências da Saúde, 2013.

1. *Cryptococcus*. 2. Genética. 3. *DNA*. 4. Fungos. I. Barros, Tânia Fraga. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 575

TALITA DE JESUS CALDAS NUNES

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE SOROTIPOS E
DETERMINAÇÃO DE *MATING TYPE* DE ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Cryptococcus* spp.**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 14 de junho de 2013.

BANCA EXAMINADORA:

Tânia Fraga Barros – Orientadora

Doutora em Microbiologia e Imunologia pela Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil.

Universidade Federal da Bahia

Samira Abdallah Hanna

Doutora em Doenças Tropicais pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Universidade Federal da Bahia

Guilherme Maranhão Chaves

Doutor em Biologia Molecular (Microbiologia) pela University of Aberdeen, ABDN, Escócia.

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

À Deus, pelo amor e compaixão aos seus.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus, que é quem me tornou capaz de chegar até aqui.

Aos meus pais, Jutai e Eliane, pelo amor e apoio incondicionais. Amo vocês.

À João, meu marido lindo, pela paciência interminável. Te amo demais.

Ao meu irmão, Júnior, pelo incentivo à educação e crescimento profissional.

À minha prima, amiga e irmã, Ilana, pela torcida. Muita saudade.

À toda minha família, pela compreensão sempre presente.

À Pró Tânia, minha grande orientadora, mãe, conselheira...enfim, exemplo de mulher acima de tudo, meu orgulho!

Ao professor Cleuber Fontes, pela confiança depositada em mim ao me indicar. Serei sempre grata.

Ao meu grupo do LPMC, Jonny, Vinny, Carolzinha, Renatinha, Juliete, Corine, Sílvia, Manu e Fábio. Vocês foram fundamentais durante essa jornada, nosso “café da tarde” curou muitas ansiedades. Obrigada pela parceria de sempre. Carols, é impossível dizer em palavras o quanto sou grata por tudo. Amo a todos.

A todos do LPA, em especial a Prof. Elisângela, pela colaboração.

Às funcionárias da Faculdade de Farmácia, Mira, Débora, Déa, Lúcia e Ritinha. Obrigada por tudo meninas. Mira, obrigada pela paciência e companheirismo.

À Milena, Mariela e Paulinha, pela amizade e torcida.

Aos meus colegas de mestrado, pelo companheirismo nessa fase de aprendizado.

Aos meus amigos sempre fiéis, que sempre depositaram confiança em mim. Em especial a Mona, pela ajuda na formatação e em todo esse processo.

À professora Samira Abdallah Hanna, pelas palavras de conforto e esclarecimentos nos momentos críticos.

À Neide, por ter iniciado essa jornada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

NUNES, Talita de Jesus Caldas. **Identificação molecular de sorotipos e determinação de *mating type* de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.** 2013. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

RESUMO

A criptococose é uma micose sistêmica causada por leveduras pertencentes ao gênero *Cryptococcus*, cujas principais espécies de importância clínica são *C. neoformans* e *C. gattii*. Essas duas espécies são divididas em cinco sorotipos (A, B, C, D e AD) e mais raramente têm sido relatados os sorotipos BD e AB. O gênero possui dois *mating types* (α e a) determinados em um único locus MAT, com dois alelos. Diferenças genéticas têm sido detectadas através de métodos moleculares e tem sido essenciais para se entender a biologia do fungo. Nesse sentido, o objetivo dessa dissertação foi avaliar a variabilidade genética, através de extração de DNA por fervura, de amostras de *Cryptococcus* isolados de casos de meningite, diagnosticados no Hospital Especializado Couto Maia, Salvador-BA, no período de 2006 a 2011. A extração de DNA foi realizada através da fervura de suspensão fúngica e a determinação do *mating type*, das variedades e do sorotipo através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase associada ao Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição (PCR-RFLP). A técnica de extração do DNA genômico por fervura foi bem reproduzida e, após ter sido empregada diretamente na reação da PCR, foi possível observar que nenhuma diferença houve com relação aos produtos da PCR com DNA extraído pela técnica tradicional. Dos 94 isolados analisados, a determinação de *mating types* e da ploidia mostrou que todos apresentaram padrão compatível com *mating type* α , assim como haploidia. A técnica molecular de sorotipagem permitiu observar que 88% dos isolados eram da variedade *grubii* (sorotipo A) e 12% da variedade *gattii* (sorotipo B). Nossos resultados mostram como se pode facilitar a PCR de leveduras com uma técnica que envolve um menor tempo de execução e menor custo, além de contribuir para a epidemiologia da criptococose, no que se refere à importância de se ter um diagnóstico diferencial entre as variedades envolvidas no processo infeccioso.

Palavras chaves: *Cryptococcus*, sorotipos, *mating type*, fervura.

NUNES, Talita de Jesus Caldas. **Molecular identification of serotypes and mating type determination of clinical isolates of *Cryptococcus* spp.**. 2013. 68 pp. Dissertation (Master in Biotechnology). Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

ABSTRACT

Cryptococcosis is a systemic mycosis caused by yeasts of the genus *Cryptococcus*, whose main species of clinical importance are *C. neoformans* and *C. gattii*. These two species are divided into five serotypes (A, B, C, D and AD) and rarely have been reported serotypes AB and BD. The genus has two mating types (α and) determined in a single locus *MAT* with two alleles. Genetic differences have been detected using molecular methods and have been essential to understand the biology of the fungus. Accordingly, the aim of this dissertation was to evaluate the genetic variability, by DNA extraction by boiling, of *Cryptococcus* samples isolated from meningitis cases diagnosed in Hospital Especializado Couto Maia, Salvador, Bahia, in the period from 2006 to 2011. DNA extraction was performed by boiling fungal suspension and determination of mating type, serotype and varieties through the technique of Polymerase Chain Reaction associated with Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). The technique of genomic DNA extraction by boiling was well reproduced and, after having been employed directly in the PCR reaction, it was observed that there was no difference with respect to the products of PCR with DNA extracted by the traditional technique. Of the 94 isolates analyzed, the determination of mating types and ploidy showed that all presented a pattern consistent with mating type α , and haploidy. The technique of molecular serotyping allowed to observe that 88% of the isolates were from variety *grubii* (serotype A), and 12% of variety *gattii* (serotype B). Our results show how it's possible to facilitate the PCR with yeast with a technique that involves a shorter execution time and lower cost, while contributing to the epidemiology of cryptococcosis, regarding the importance of having a differential diagnosis between varieties involved in the infectious process.

Keywords: *Cryptococcus*, serotypes, *mating type*, boiling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Ciclo de vida de <i>Cryptococcus</i> .	16
Figura 02	Estrutura celular de <i>Cryptococcus</i> .	18
Figura 03	Patogênese da criptococose.	20
Figura 04	Cápsula de <i>Cryptococcus</i> .	23
Figura 05	Morfologia colonial de <i>Cryptococcus</i> .	23
Figura 06	Prova da urease.	24
Figura 07	<i>Cryptococcus</i> em meio de canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB).	25
Figura 08	Internações por micoses sistêmicas no Brasil, no período de 2000 a 2007.	28
Figura 09	Integridade do DNA genômico de isolados de <i>Cryptococcus</i> , em gel de agarose a 0,8%.	39
Figura 10	Produtos de amplificação do <i>mating type</i> de cepas de referência de <i>Cryptococcus</i> , em gel de poliacrilamida a 12%.	40
Figura 11	Produtos de amplificação do <i>mating type</i> de cepas de referência de <i>Cryptococcus</i> a partir da extração por fervura, em gel de poliacrilamida a 12%.	40
Figura 12	Produtos de amplificação do <i>mating type</i> de isolados clínicos de <i>Cryptococcus</i> , em gel de poliacrilamida a 12%.	41
Figura 13	Mapa de restrição da cepa de referência WM 629 (variedade <i>neoformans</i>).	42
Figura 14	Perfil de RFLP do <i>mating type</i> da cepa de referência WM 629 (variedade <i>neoformans</i>), em gel de poliacrilamida a 12%.	42
Figura 15	Mapa de restrição da cepa de referência WM 148 (variedade <i>grubii</i>).	43

Figura 16	Perfil de RFLP do <i>mating type</i> da cepa de referência WM 148 (variedade <i>grubii</i>), em gel de poliacrilamida a 12%.	44
Figura 17	Mapa de restrição da cepa de referência WM 178 (variedade <i>gattii</i>).	44
Figura 18	Perfil de RFLP do <i>mating type</i> da cepa de referência WM 779 (variedade <i>gattii</i>), em gel de poliacrilamida a 12%.	45
Figura 19	Perfil de RFLP do <i>mating type</i> de isolado clínico de <i>C. neoformans</i> (variedade <i>grubii</i>), em gel de poliacrilamida a 12%.	46
Figura 20	Perfil de RFLP do <i>mating type</i> de isolado clínico de <i>C. gattii</i> , em gel de poliacrilamida a 12%.	46
Figura 21	Produtos de amplificação do gene <i>CAP59</i> de cepas de referência de <i>Cryptococcus</i> , em gel de poliacrilamida a 8%.	48
Figura 22	Produtos de amplificação do gene <i>CAP59</i> de isolados clínicos de <i>Cryptococcus</i> , em gel de poliacrilamida a 8%.	48
Figura 23	Perfil de RFLP do gene <i>CAP59</i> de cepas de referência de <i>Cryptococcus</i> , em gel de poliacrilamida a 8%.	49
Figura 24	Perfil de RFLP do gene <i>CAP59</i> de cepas de referência de <i>Cryptococcus</i> com a enzima <i>Agel</i> , em gel de poliacrilamida a 8%.	49
Figura 25	Perfil de RFLP do gene <i>CAP59</i> de isolados clínicos de <i>Cryptococcus</i> , em gel de poliacrilamida a 8%.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Perfil das cepas de referência.	32
Tabela 02	Estimativa de massa dos fragmentos de DNA do fago λ digerido pela enzima <i>HindIII</i> .	34
Tabela 03	Sítios de restrição das enzimas <i>EatI</i> , <i>AluI</i> , <i>HgaI</i> , <i>Tsp45I</i> , <i>HpaII</i> e <i>AclI</i> .	36
Tabela 04	Sítios de restrição das enzimas <i>BsmFI</i> , <i>HpaII</i> e <i>AgeI</i> .	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 <i>Cryptococcus</i> E SUAS PERSPECTIVAS	13
2.2 CICLO E TRANSMISSÃO DA CRIPTOCOCOSE	14
2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA	17
2.4 PATOGÊNESE	19
2.4.1 Sintomatologia	21
2.5 DIAGNÓSTICO	22
2.5.1 Diagnóstico microbiológico	22
2.5.2 Diagnóstico molecular	26
2.6 EPIDEMIOLOGIA	27
2.7 TRATAMENTO	29
3 OBJETIVO	31
3.1 OBJETIVO GERAL	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4 METODOLOGIA	32
4.1 MICRO-ORGANISMOS	32
4.2 EXTRAÇÃO DE DNA	33
4.3 DETERMINAÇÃO DE <i>MATING TYPES</i> E VARIEDADES	34
4.3.1 Amplificação do gene <i>MAT</i> através da Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)	34

4.3.2 Polimorfismo de Restrição por Tamanho de Fragmento associado à PCR (PCR-RFLP) do gene <i>MAT</i>	35
4.3.2.1 Construção do mapa de restrição	36
4.4 DETERMINAÇÃO DE SOROTIPOS	36
4.4.1 Amplificação do gene <i>CAP59</i> através de PCR	36
4.4.2 PCR-RFLP do gene <i>CAP59</i>	37
5 RESULTADOS	39
6 DISCUSSÃO	51
7 CONCLUSÃO	58
8 PERSPECTIVAS	59
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

A criptococose é uma micose sistêmica que se caracteriza por ser uma infecção fúngica oportunista de distribuição universal acometendo principalmente imunodeprimidos com alguma doença de base como neoplasia, diabetes, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), lúpus eritematoso sistêmico, sarcoidose, linfomas, doenças pulmonares crônicas, corticoideterapia e drogas imunossupressoras. A infecção apresenta-se sob a forma de lesões graves, principalmente as manifestações pulmonares e as do sistema nervoso central (SNC), sendo a meningoencefalite a forma mais freqüente e agressiva.

Trata-se de uma doença de grande importância epidemiológica e com elevada letalidade, apresentando um sério potencial patológico, especialmente para indivíduos imunocomprometidos. Os basidiósporos resultantes da reprodução sexuada no ambiente penetram no organismo pelo trato respiratório, onde podem se desenvolver ou cair na corrente sanguínea infectando outros órgãos, evoluindo para meningoencefalite.

A recorrência de criptococose em pacientes com SIDA é um problema crescente, e existem evidências de que ela ocorra devido à reativação da infecção pela linhagem que a originou. Entretanto, há relatos de re-infecção por linhagens novas. Vários autores têm demonstrado diferenças genéticas entre as variedades do *Cryptococcus* através de métodos moleculares, e esses estudos tem sido essenciais para se entender a biologia do fungo e para que se possa atuar na terapia contra a infecção.

Pelo fato da produção e distribuição do único kit comercial para caracterização de sorotipos de *Cryptococcus* (Crypto Check, Iatron Laboratories) terem sido interrompidas, desde 2004, alguns autores vêm trabalhando a diferenciação dos sorotipos desse micro-organismo através de técnicas moleculares. Nosso grupo de pesquisa vem trabalhando na caracterização fenotípica e genotípica de isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus*. E este trabalho visa dar continuidade a esse estudo estabelecendo a variabilidade genética de isolados clínicos com relação a determinação de sorotipos, variedade e *mating-type*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Cryptococcus* E SUAS PERSPECTIVAS

De acordo com o revisor Negroni (2012), há quase 120 anos, o primeiro caso de criptococose foi reportado em 1894 por Busse e Buschke. Tratava-se de uma mulher de 31 anos que apresentava lesões pseudosarcomatosas na tíbia, de onde foi isolado um fungo denominado, na época, *Saccharomyces neoformans*. No mesmo período, Sanfelice isolou o mesmo fungo de suco de pêra e percebeu sua capacidade de causar infecção em animais. No entanto, em 1901, após verificar a ausência de ascósporos, Vuillemin caracterizou o organismo no gênero *Cryptococcus*. Cerca de quatro anos depois, o primeiro caso criptococose meningoencefálica foi reportado por Hansemann.

Baseada na forma telemórfica ou perfeita, taxonomicamente *Cryptococcus* é um basidiomiceto, classificado dentro do Reino Fungi; filo Basidiomycota; ordem Filobasidiales; família Filobasidiaceae; gênero *Filobasidiella*; espécies *Filobasidiella neoformans* e *F. bacillispora*. Sendo correspondentes às suas formas anamorfias *C. neoformans* e *C. gattii*, respectivamente (CASADEVALL, PERFECT, 1998; KURTZMAN, FELL, 1998). Além dessas duas, já se tem pelo menos 39 espécies descritas (PASA, 2011).

Cryptococcus é uma levedura arredondada, encapsulada, que mede aproximadamente de 1 a 2µm, sendo o agente etiológico de uma das mais graves micoses oportunistas, a criptococose (HALLIDAY et al., 1999). O gênero compreende poucas espécies de interesse médico, as quais possuem diferentes características quanto à virulência. A espécie *C. neoformans* incluía as variedades *grubii*, *neoformans* e *gattii*, entretanto, estudos moleculares revelaram a variedade *gattii* como uma nova espécie. Dessa forma, se atribui o termo Complexo *C. neoformans* às duas variedades da espécie *C. neoformans* (*grubii* / *neoformans*) e ao *C. gattii*, compreendendo as espécies de maior importância clínica (ALVAREZ et al., 2013). No entanto, nos últimos anos houveram relatos de criptococose causada

por espécies não complexo como *C. laurentii* e *C. albidus* (FRANZOT et al., 1999; CHENG et al., 2001; ARAUJO et al., 2012).

O gênero possui dois *mating-types* (α e *a*), que significa o “sexo” do fungo, determinados em um único locus *MAT*, com dois alelos. Uma das características mais interessantes desse gênero é o desequilíbrio entre a prevalência de tipos de *mating-type* no ambiente, bem como nas amostras clínicas. Quase todos os isolados descritos são do tipo α (KWON-CHUNG, BENNETT, 1978). No entanto, alguns raros isolados identificados como *MAT* α /*a* são considerados por serem ocasionalmente diploides ou cepas aneuplóides (CHATURVEDI et al., 2000; LENGELER et al., 2001).

Baseado na especificidade antigênica do polissacarídeo capsular e em análises filogenéticas observa-se cinco sorotipos: *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A), *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) e *C. gattii* (sorotipos B e C). O sorotipo AD é considerado o quinto sorotipo do complexo e outros sorotipos híbridos têm sido descritos entre as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, como os BD e AB (KATSU et al., 2004; LIN, HEITMAN, 2006; BOVERS et al., 2008). Esses sorotipos diferem quanto à distribuição geográfica, epidemiologia, manifestação clínica e sensibilidade aos antifúngicos (ITO-KUWA, 2008; TRABULSI, 2008). *Cryptococcus* pode ser classificado ainda em genótipos: VNI e VNII compreendendo isolados do sorotipo A; VNIII, isolados do sorotipo AD; e VNIV, isolados do sorotipo D. Os sorotipos B e C incluem os genótipos VGI, VGII, VGIII e VGIV (FINDLEY et al., 2009).

2.2 CICLO E TRANSMISSÃO DA CRIPTOCOCOSE

Enquanto a maioria dos seres, que se reproduzem sexualmente, possui dois sexos ou *mating-types*, transições na sexualidade entre dois ou mais *mating-types* tem ocorrido no reino Fungi. A reprodução sexuada é bastante comum entre os fungos e o *mating-type* pode ocorrer em dois padrões: bipolar e tetrapolar. No sistema bipolar, um único locus *MAT* ocorre em dois alelos, já citados (*a* e α), que determinam a identidade da célula. Espécies com esse sistema são encontradas nas classes dos

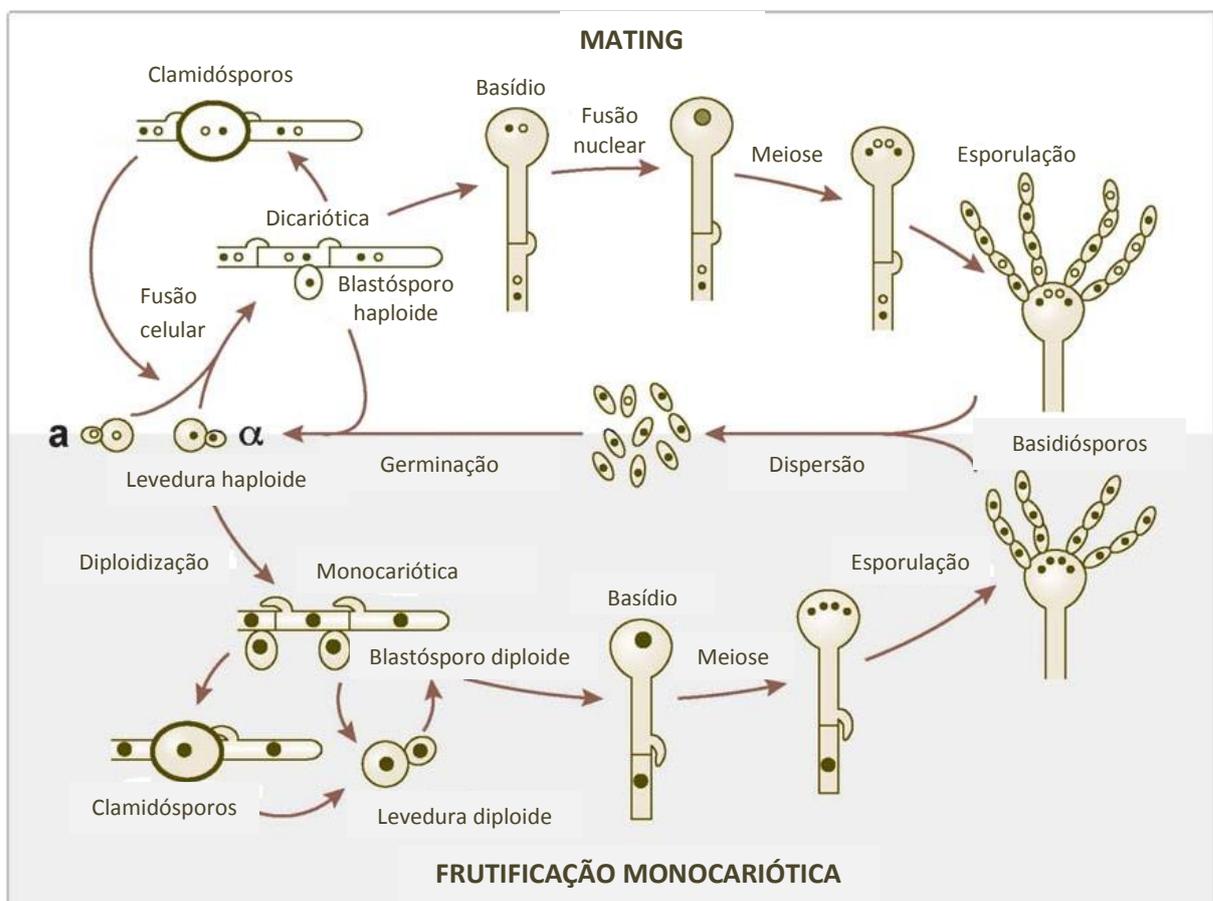
ascomicetos, basidiomicetos e zigomicetos. No entanto, na classe dos basidiomicetos, diversas espécies possuem um sistema mais complexo, o tetrapolar, em que estão presentes dois loci determinantes da identidade sexual, um deles codificando fatores de transcrição de homodomínio e o outro codificando os feromônios e seus receptores. Em muitas dessas espécies, esses dois loci são multialélicos, resultando em milhares de *mating-types* diferentes. Transições do sistema tetrapolar para o bipolar ocorreram diversas vezes, e em muitos exemplos foram resultantes de uma fusão entre os dois loci para formar um único, o que mostra o efeito da pressão evolutiva sobre os *mating-types*/sexos, limitando-os a dois tipos (BOTES et al., 2009; METIN, FINDLEY, HEITMAN, 2010).

Um estudo comparativo entre as variedades *C. neoformans* var. *grubii*, *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. gattii* revelou que o locus *MAT* é composto por quatro classes de genes de idades evolutivas distintas, uma contendo genes ancestrais, duas contendo genes de origem evolutiva intermediária e outra contendo genes adquiridos recentemente. Visto que o locus *MAT* bipolar de *Cryptococcus* envolve todos os genes normalmente encontrados no sistema tetrapolar, sugere-se que uma fusão entre dois loci poderia estar envolvida na origem deste grupo gênico associado à virulência e diferenciação. Um modelo hipotético afirma que um sistema tetrapolar ancestral expandiu-se com uma série de aquisições de genes relacionados para formar dois grandes grupos gênicos. Esses sofreram uma fusão por meio de translocação cromossômica, a fim de formar uma fase tripolar instável. Essa, porém, após passar por recombinações e conversões gênicas, formou o sistema bipolar (METIN, FINDLEY, HEITMAN, 2010).

A reprodução sexuada do complexo de espécies patogênicas de *Cryptococcus* envolve um sistema bipolar bem definido (Figura 01). A fusão entre duas células de *mating-types* opostos resulta na formação de uma hifa dicariótica. Em seguida, as hifas se diferenciam para formar basídios, nos quais ocorre a fusão nuclear e meiose. Na superfície dos basídios são formadas longas cadeias de basidiósporos α e α , que serão dispersos no ambiente, representando possíveis propágulos infectantes. Embora seja preferível uma reprodução entre *mating-types* diferentes, *Cryptococcus* pode reproduzir-se unissexualmente, em especial entre células α , para produzir células estáveis diplóides (α/α) ou células haplóides (α). Quando um

isolado de sorotipo A cruza com outro de sorotipo D, a fusão celular ocorre normalmente, porém a meiose é impedida devido a diferenças genéticas entre os dois sorotipos, resultando num pequeno número de células haplóides viáveis. Entretanto, apesar disso, algumas células híbridas AD podem se propagar por mitose como células diplóides mononucleadas (LIN et al., 2008; METIN, FINDLEY, HEITMAN, 2010).

Figura 01: Ciclo de vida de *Cryptococcus*.



Fonte: LIN, HEITMAN, 2006, adaptado.

A fase assexuada é predominantemente haploide e sua reprodução ocorre por brotamento, de forma que ocorre um prolongamento da célula mãe e a divisão do núcleo, formando uma célula filha idêntica à sua antecessora. Os basidiósporos resultantes da reprodução sexuada no ambiente penetram no organismo pelo trato respiratório, onde podem se desenvolver ou cair na corrente sanguínea infectando

outros órgãos, principalmente o sistema nervoso central (SNC), evoluindo assim para meningoencefalite (COUTINHO, 2006; XUE et al., 2007).

A espécie *C. neoformans* tem como principal reservatório o pombo (*Columba livia*), que através de suas excretas contamina o solo, dando, portanto, um caráter urbano de distribuição global. Em contraste, a espécie *C. gattii* é geralmente isolada de ambientes silvestres, onde há a decomposição de cascas, folhas e madeira, apresentando uma maior incidência em áreas tropicais e subtropicais (SOUZA et al., 2005). Visto que o esporo consegue sobreviver em material dessecado por anos, diversos substratos contaminados com o fungo podem representar fontes de infecção por tempo prolongado. Além disso, a levedura já foi isolada de diversos tipos de alimentos, sugerindo, portanto, que água ou comida contaminada possam também representar fontes potenciais de infecção (TRABULSI, 2008; DEL POETA, CASADEVALL, 2011). Alguns estudos mostram ainda a transmissão através de transplante de órgãos sólidos (SUN, WAGENER, SINGH, 2009; SUN et al., 2010; BADDLEY et al., 2011).

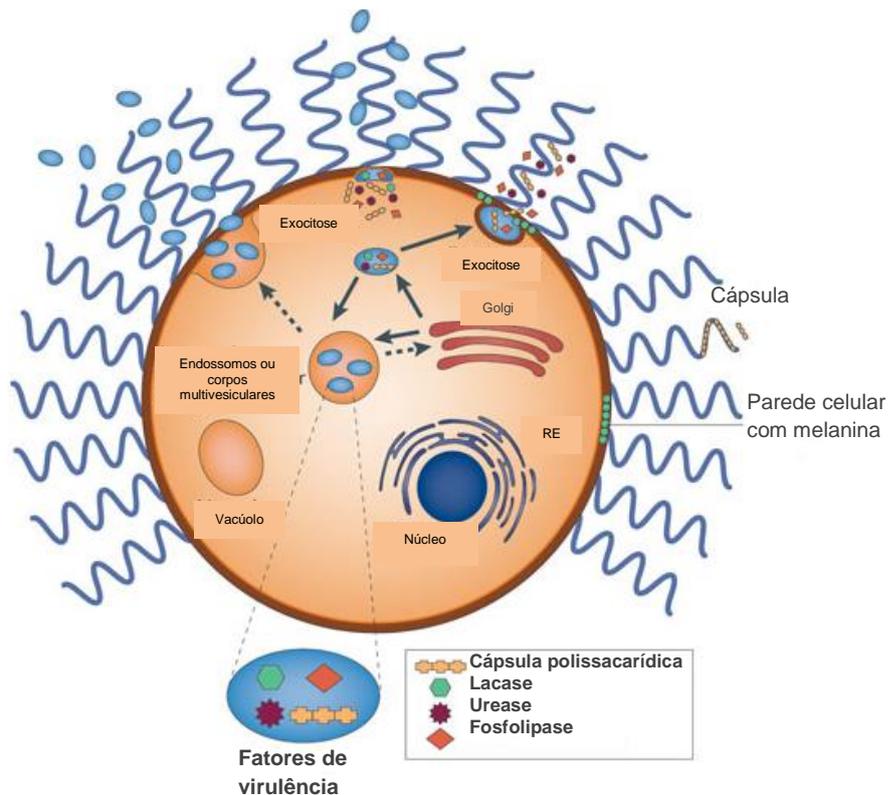
2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

Alguns fatores inerentes ao gênero *Cryptococcus* vem sendo estudados e classificados como fatores de virulência, como por exemplo, capacidade de crescer a 37°C, presença de cápsula, produção de melanina e presença das enzimas urease, fosfolipase e proteinase (BUCHANAN, MURPHY, 1998).

A cápsula é composta por dois tipos de polissacarídeo, a galactoxilomanana e a glucoroxilomanana (GXM), que compõe quase toda sua estrutura, cerca de 90% da massa capsular (Figura 02). O tamanho capsular é regulado por diversas condições ambientais, como a disponibilidade de gás carbônico e concentração de Ferro. Elementos relacionados ao hospedeiro também parecem interferir nesse sentido, visto que a espessura da cápsula varia de acordo com o tecido infectado (FRASES et al., 2009). Atua como uma barreira contra o sistema imune do hospedeiro, impedindo a fagocitose por ser pouco imunogênica. (McFADDEN et al., 2006). Em

um estudo comparativo do conteúdo polissacarídico capsular de *C. neoformans* e *C. liquefaciens*, Araujo e colaboradores (2012) demonstraram diferenças significativas de viscosidade, propriedade elástica e parâmetros como rigidez e diâmetro entre as duas espécies, sugerindo que, apesar da estrutura capsular entre as espécies patogênicas e não patogênicas ser semelhante, existem diferenças que podem influenciar diretamente no potencial de virulência.

Figura 02: Estrutura celular de *Cryptococcus*.



Fonte: KRONSTAD et al., 2011, adaptado.

Segundo estudo de Florio e colaboradores (2011), quando o *C. neoformans* é exposto à presença de algum agente antifúngico há uma alteração de genes relacionados à resposta ao estresse oxidativo, genes que codificam fatores de virulência e genes envolvidos na produção de ergosterol, alvo do fluconazol, promovendo resistência. A melanina apresenta a função de proteger as células fúngicas de atividades microbicida e oxidativa do sistema imune do hospedeiro. A lacase, enzima que catalisa parte da biossíntese da melanina, tem sua sequência

genética utilizada para construção de iniciadores usados na identificação molecular de sorotipos (ITO-KUWA, 2008; LIAW et al., 2009).

A urease é uma metaloenzima que catalisa a hidrólise da uréia em amônia e carbamato, provocando aumento do pH fisiológico. É provável que o principal papel dessa enzima seja converter a ureia em uma fonte utilizável de nitrogênio. Embora haja relatos esporádicos de isolados urease negativa, sabe-se que a grande maioria direciona grande quantidade de energia para a produção dessa enzima extracelular. No entanto, o mecanismo pelo qual a enzima urease contribui para a virulência do fungo ainda não está bem estabelecido (COX et al., 2000; OLSZEWSKI et al., 2004; OSTERHOLZER et al., 2009).

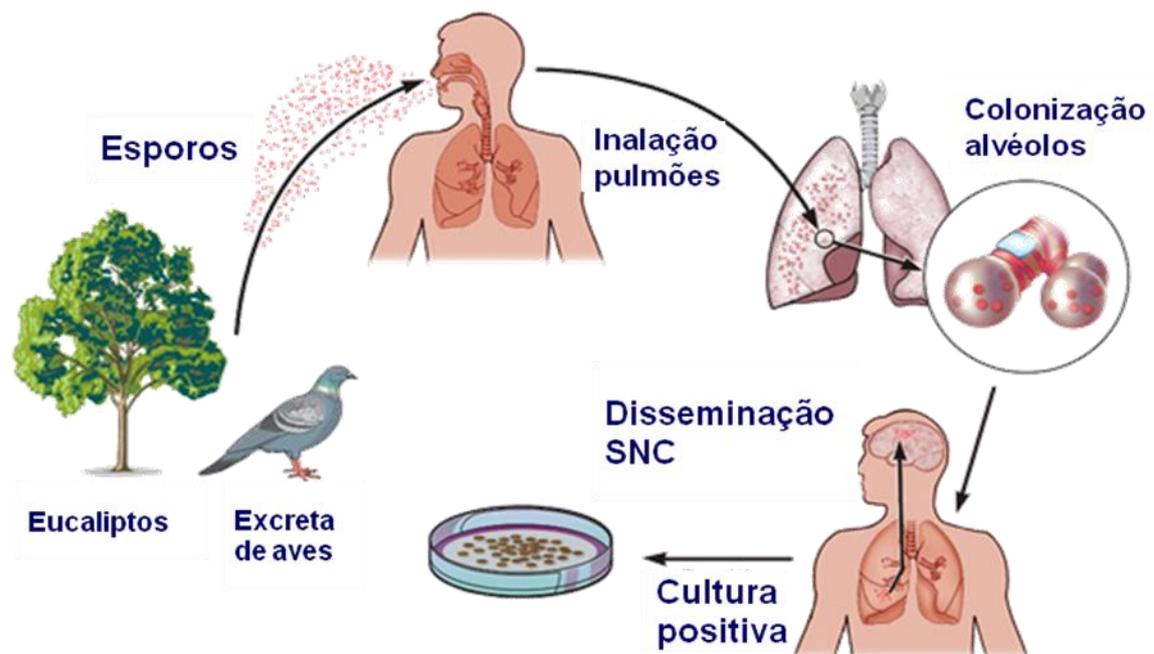
Tanto o sorotipo quanto o *mating-type* possuem correlação com os fatores de virulência do fungo. O sorotipo A está associado a um alto nível de patogenicidade e tem sido agente da maioria das infecções. O *mating-type* α é predominante entre os isolados clínicos e ambientais e demonstra ser mais patogênico que o *mating-type* a. Outra característica importante é a variedade do *Cryptococcus*, visto que a variedade *neoformans* tem sido reportada como menos virulenta do que a variedade *grubii*, além de mais suscetível ao fluconazol, uma das drogas de escolha no tratamento da criptococose. *C. gattii* tem apresentado baixa suscetibilidade a muitos antifúngicos, exigindo um tratamento prolongado e tendo alta taxa de mortalidade (FENG et al., 2008; LIAW et al., 2009; LIN et al., 2008).

2.4 PATOGÊNESE

Para causar infecção, algumas condições se fazem necessárias para que a levedura se desenvolva dentro do organismo do hospedeiro. À medida que a levedura cresce à temperatura de 37°C, em um ambiente com cerca de 5% de CO₂ e um pH entre 7,3 e 7,4, é ativado um mecanismo de produção de calcineurina, essencial para a virulência, que possivelmente está envolvido na transdução de sinal necessária para a patogênese deste micro-organismo, permitindo sua sobrevivência mesmo em temperaturas elevadas (ODOM et al., 1997; KOZUBOWSKI, HEITMAN, 2012).

Através da inalação, blastoconídios e basidiósporos chegam até os alvéolos pulmonares, onde começam a se reproduzir e invadir outros tecidos (Figura 03). As infecções pulmonares são normalmente assintomáticas ou subclínicas, no entanto, qualquer falha no sistema imunológico do hospedeiro é suficiente para reativação da doença. A cápsula permite que o fungo se proteja da imunidade inata do indivíduo, deprimindo a atividade das células T CD4, aumentando a atividade das células T citotóxicas (CD8) e ativando os linfócitos B, com formação de imunocomplexos. Um excesso de produção do antígeno capsular impede uma fagocitose efetiva e a formação de granulomas epitelióides, que restringiriam a infecção. Na criptococose associada à SIDA é comum se observar altas taxas desse antígeno capsular, o que origina uma resposta imune desordenada, aumentando a degradação da imunidade celular causada pelo vírus HIV (NEGRONI, 2012). Segundo Del Poeta e Casadevall (2011), considerando que a infecção por *C. neoformans* poderia contribuir para o desenvolvimento de alergia, a interação desse fungo com o sistema imune é mais complexa do que se imagina.

Figura 03: Patogênese da criptococose.



Fonte: CRIPTOCOCOSE, 2009.

2.4.1 Sintomatologia

Quando limitada ao pulmão, a infecção por *Cryptococcus* pode causar pneumonia, nódulos pulmonares e, raramente, efusão pleural. Em indivíduos imunocompetentes, a levedura produz uma reação inflamatória proliferativa com a formação de granulomas, com células gigantes e uma camada periférica de linfócitos. Quando esses pacientes se tornam crônicos, há uma formação de uma espécie de manta de tecido fibroso que não calcifica (NEGRONI, 2012). Ao passo que falhas imunológicas estão muito associadas a pacientes que evoluem para infecção disseminada e meningite, pacientes com infecção restrita aos pulmões normalmente são imunocompetentes (KOZUBOWSKI, LEE, HEITMAN, 2009). Sabe-se que esta levedura possui um tropismo pelo SNC, provavelmente devido à utilização de catecolaminas para seu desenvolvimento. Este fato somado à inabilidade do tecido cerebral gerar uma resposta imune efetiva torna o SNC um órgão susceptível a esse tipo de infecção (MITCHELL, PERFECT, 1995; NEGRONI, 2012).

A meningite criptocócica, diferentemente da meningite bacteriana, nem sempre apresenta rigidez na nuca e febre. Em indivíduos imunocompetentes se manifesta de forma subaguda ou crônica, podendo se apresentar com relatos de dor de cabeça, mudanças de comportamento, hipertermia branda, fadiga, distúrbios visuais, vômitos. Outro sinal bastante freqüente é a paralisia dos nervos cranianos, no entanto, o diagnóstico frequentemente só é dado semanas ou até meses após o início dos sintomas. A cultura do líquido resulta no crescimento da levedura em 90% dos pacientes. Em indivíduos imunocomprometidos, particularmente os portadores de SIDA, a meningoencefalite ocorre em mais de 90% dos casos, cursando de forma aguda. Quando essa meningite tem como agente etiológico *C. gattii* geralmente apresenta uma produção de massa no parênquima cerebral com sinais de hipertensão intracraniana. Nesses casos, o quadro é mais grave e cursa com baixa resposta ao tratamento antifúngico. A meningite criptocócica tem um prognóstico particular, e sem tratamento pode ser fatal. Sua evolução é determinada pelo estado imune do paciente e pela severidade do aumento da pressão intracraniana. Nos casos associados a SIDA, a maioria das mortes ocorre dentro de três semanas após o diagnóstico (MITCHELL, PERFECT, 1995; LACAZ et al., 2002; NEGRONI, 2012).

A criptococose pulmonar crônica se manifesta como a tuberculose, com perda de peso, febre prolongada, anorexia, fadiga, tosse e hemoptise. Entretanto, a doença pode se apresentar de forma mais incomum, como a criptococose ocular, causando endoftalmite, perda de visão e paralisia do nervo ocular. Há também relatos de criptococose cutânea, com o surgimento de pápulas ulcerativas espalhadas pela pele. Esse tipo de lesão acomete cerca de 6% dos pacientes com criptococose disseminada associada a SIDA e 10 a 15% dos pacientes com outro tipo de comprometimento imunológico (NEGRONI, 2012).

2.5 DIAGNÓSTICO

2.5.1 Diagnóstico Microbiológico

Um diagnóstico feito precocemente e a administração da terapia antifúngica correta são fundamentais para minimizar a gravidade da criptococose (SAHA et al., 2009). O diagnóstico laboratorial pode ser dado a partir de diversas amostras clínicas, como líquido, sangue, urina, escarro, fragmentos de tecido, dentre outras. No exame direto destaca-se a presença de leveduras arredondadas, envoltas por cápsula polissacarídica, que é evidenciada na contra-coloração feita com tinta nanquim ou tinta da China (Figura 04). Amostras de escarro e amostras purulentas podem ser tratadas com hidróxido de potássio (KOH) a 10% para evitar que células do hospedeiro sejam confundidas com as leveduras de *Cryptococcus*. Além do exame direto da amostra, outros métodos podem ser realizados, como exame histológico, cultura e sorologia. A identificação através de exame histopatológico é feita pela observação das características micromorfológicas da levedura em amostras de biópsia, incluindo técnicas histoquímicas como hematoxilina e eosina (HE) e coloração de Prata, como a de Grocott, bem como técnicas mais específicas como Mucicarmim de Mayer, que cora a cápsula num tom magenta, e Fontana-Masson, que cora a melanina fúngica de marrom-avermelhado (PEDROSO, CANDIDO, 2006; GAZZONI et al., 2009).

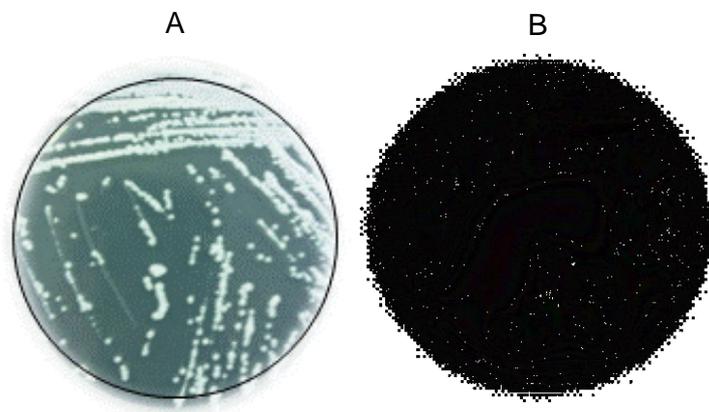
Figura 04: Cápsula de *Cryptococcus*.



Fonte: FUN WITH MICROBIOLOGY, 2010.

A cultura é feita em meio de ágar Sabouraud sem cicloheximida, visto que se trata de um fungo sensível a esse antifúngico. Nesse meio, após crescimento de 48 a 72 horas, em temperatura de 30°C, as colônias apresentam aspecto brilhante, variação de cor geralmente entre branca, creme e rosa-claro, além de serem bastante mucóides, o que alguns autores denominam “aspecto de leite condensado” (Figura 05-A) (SIDRIM, ROCHA, 2004).

Figura 05: Morfologia colonial de *Cryptococcus*.



Fonte: A autora. (A) Ágar Sabouraud; (B) Ágar Niger.

Meios diferenciais, como ágar niger, cenoura, L-dopa ou qualquer outro que tenha ácido caféico ou compostos di ou polifenólicos em sua composição, podem também ser usados como meio diferencial. Nesses meios, a enzima fenoloxidase produzida pelo fungo utiliza os compostos citados como substratos numa reação de oxidação, dando às colônias uma tonalidade amarronzada, facilitando a distinção entre colônias de leveduras de outros gêneros (Figura 05-B). Vale ressaltar que esses meios não devem ter em sua composição mais que 0,1% de glicose, já que altas concentrações da mesma podem inibir a formação do pigmento marrom (LACAZ et al., 2002; PEDROSO, CANDIDO, 2006). O teste da urease também é utilizado para identificação de leveduras desse gênero, de forma que todas as espécies de *Cryptococcus* apresentam positividade para essa prova (Figura 06) (SIDRIM, ROCHA, 2004).

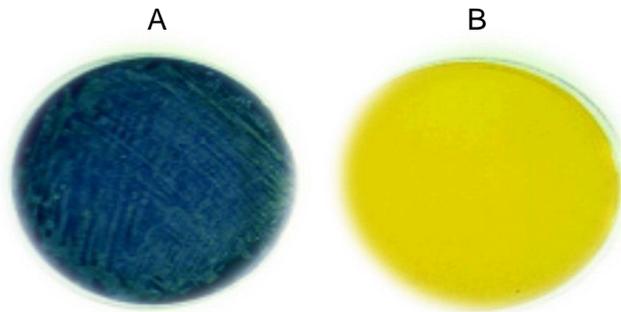
Figura 06: Prova da urease.



Fonte: A autora. (A) Urease negativa; (B) Urease positiva.

Para diferenciação entre as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* na rotina utiliza-se o meio de cultura Canavanina-Glicina-Azul de bromotimol (CGB). *C. gattii*, além de ser resistente à canavanina, é capaz de utilizar a glicina como única fonte de carbono. Dessa forma, isolados dessa espécie são capazes de crescer no meio CGB, modificando a coloração do meio para azul cobalto (Figura 07-A). Diferentemente, isolados de *C. neoformans* não utilizam a glicina como única fonte de carbono, além de serem sensíveis à canavanina. Portanto, não são capazes de crescer nesse meio, mantendo sua coloração inicial (Figura 07-B) (KWON-CHUNG, POLACHECK, BENNETT, 1982).

Figura 07: *Cryptococcus* em meio de canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB).



Fonte: UNIVERSITY OF ADELAIDE. (A) *C. gattii*; (B) *C. neoformans*.

Visto que as espécies não-*neoformans* e não-*gattii* estão cada vez mais presentes na literatura (CHENG et al., 2001; LEE et al., 2004; BANERJEE et al., 2013), a identificação dessas leveduras pelas provas de assimilação de carboidratos e nitrogênio e fermentação de carboidratos é uma ferramenta imprescindível, e uma importante característica desse gênero é não fermentar nenhum dos carboidratos (SIDRIM, ROCHA, 2004).

A sorologia também é bastante utilizada no diagnóstico da criptococose. Durante o processo infeccioso, antígenos capsulares polissacarídicos (CrAg) são encontrados em fluidos corporais, podendo ser detectados e quantificados em testes de aglutinação em látex (PEDROSO, CANDIDO, 2006). Apesar de ser considerado um teste rápido e seguro, o teste de aglutinação em látex sofre com a limitação da falsa positividade, gerada pelo fator reumatóide e pela reação cruzada em infecções por *Trichosporon beigeli*, além de outros micro-organismos. Dessa forma, testes de enzima-imunoensaio (ELISA) para detecção desses antígenos foram desenvolvidos com o intuito de minimizar os interferentes analíticos, visto que no teste de ELISA não há reação com o fator reumatóide, além de detectar pequenas quantidades do antígeno na amostra, bem como não sofrer o efeito prozona, quando não há aglutinação devido ao desequilíbrio na relação antígenoXanticorpo (PEDROSO, CANDIDO, 2006; DOMINIC et al., 2009; SAHA et al., 2009). No entanto, Gazzoni e

colaboradores (2009) demonstraram que infecções com cepas deficientes de cápsula podem gerar resultados falsos negativos. Em geral, embora haja kits comerciais diferentes, os testes de detecção de CrAg detectam no mínimo 10ng de antígeno por mL de fluido biológico. Portanto, em casos de cepas com deficiência capsular há uma produção insuficiente de CrAg, indetectável pelos kits. Pacientes com criptococose pulmonar primária sem disseminação também podem apresentar resultados falsos negativos em amostras de soro, uma vez que a levedura ainda está localizada nos pulmões.

2.5.2 Diagnóstico Molecular

Os métodos moleculares são uma alternativa excelente para se obter um diagnóstico confiável, precoce e com alta sensibilidade e especificidade, só necessitando de um volume pequeno da amostra clínica. Logo, representam uma ferramenta promissora para a análise de amostras de pacientes com suspeita clínica de criptococose (PEDROSO, CANDIDO, 2006; SAHA et al., 2009). As técnicas de biologia molecular permitem não só o diagnóstico, mas também a caracterização das linhagens e distinção entre as cepas, podendo indicar recidiva ou uma nova infecção. Dessa forma, contribuem também para estudos de epidemiologia molecular, essenciais para a compreensão da patogênese e virulência do fungo (PASA, 2011).

Dentre as técnicas mais utilizadas, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (Random Amplified Polymorphic DNA - RAPD) são frequentemente empregadas na tipagem de *C. neoformans* (MEYER et al., 1999; CASALI et al., 2003). Além dessas, a técnica da PCR associada ao Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP) é bastante utilizada envolvendo, por exemplo, a amplificação dos genes *MAT*, *URA5* e *CAP59* na diferenciação de genótipos, variedades e sorotipos (CHATURVEDI et al., 2000; ENACHE-ANGOULVANT et al., 2007; MATOS et al., 2012).

Visto que tais metodologias reduzem bastante o tempo do diagnóstico, além de oferecerem segurança na aplicação da terapia adequada, algumas pesquisas tentam mostrar a sua aplicabilidade na rotina laboratorial, com a detecção direta de fluidos biológicos. Paschoal e colaboradores (2004) realizaram um estudo com identificação de *C. neoformans* por PCR em amostras de líquido e, após uma comparação das técnicas utilizadas, mostrou sensibilidade de 92,9% da PCR em relação à cultura (76,8%) e à prova da tinta nanquim (85,7%), apesar de todas as três técnicas apresentarem 100% de especificidade. A associação PCR-RFLP é também utilizada na detecção de fungemia por *Candida*, *Cryptococcus* e *Histoplasma*, como mostrado no trabalho de Santos e colaboradores (2010).

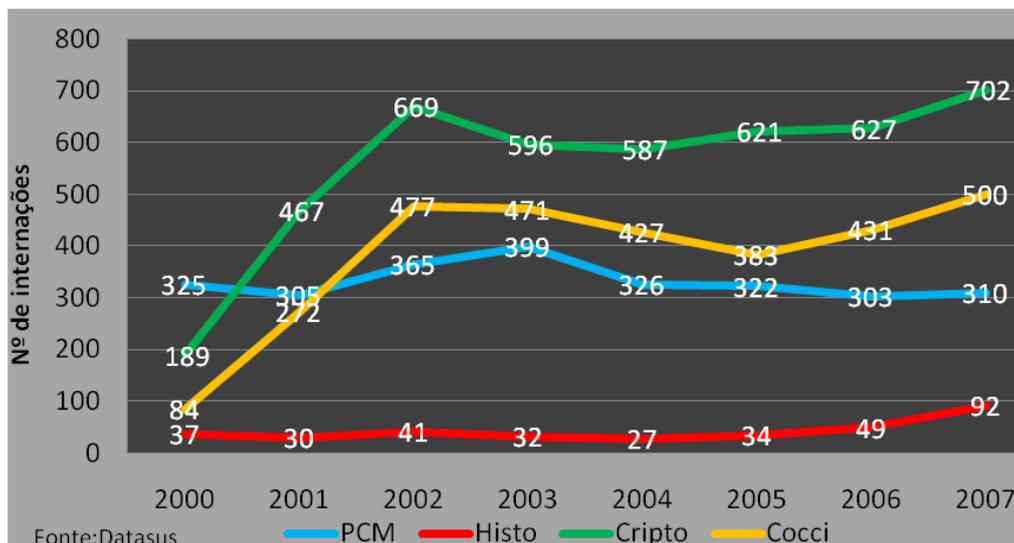
2.6 EPIDEMIOLOGIA

Estima-se que a incidência de criptococose em pacientes com SIDA seja de mais de um milhão de novos casos por ano. Dessa forma, tem sido a causa de 650.000 mortes por ano, ultrapassando o número de mortes causadas por tuberculose nesse grupo de indivíduos (DEL POETA, CASADEVALL, 2011). Trata-se de uma doença de grande importância epidemiológica e com elevada letalidade, apresentando um sério potencial patológico, especialmente para indivíduos imunocomprometidos (COUTINHO, 2006). No entanto, desde o surto ocorrido entre 2004-2007 em Vancouver, Canadá, tem sido relatados casos de criptococose em indivíduos imunocompetentes causada pela espécie *C. gattii*. Entretanto, é possível que a percepção que se tem atualmente de “imunocompetente” seja resultado de uma incapacidade de detectar alguma imunodeficiência ainda desconhecida (PERFECT et al., 2010; DEL POETA, CASADEVALL, 2011).

Casos sem fatores de predisposição são mais comuns em homens com acima de 40 anos. Do ponto de vista epidemiológico, a criptococose apresenta um comportamento que oscila entre uma micose endêmica e oportunista (NEGRONI, 2012). Há anos esse micro-organismo vem emergindo, se utilizando de ferramentas clínicas e geográficas de forma inesperada, o que torna a criptococose um problema de saúde pública mundial (DEL POETA, CASADEVALL, 2011). De acordo com o

Ministério da Saúde, criptococose é a micose sistêmica mais prevalente no Brasil em nível de internações, sendo a região Sudeste responsável pelo maior número de casos, talvez pelo seu maior número de notificações de SIDA (Figura 08). Nas regiões Norte e Nordeste há um grande número de casos de criptococose em indivíduos sem relato de imunodepressão, HIV negativos, causadas por *C. gattii*. Nessas regiões, a meningoencefalite criptocócica ocorre em nativos, incluindo jovens e crianças, com elevada morbidade e letalidade (37 a 49%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Figura 08: Internações por micoses sistêmicas no Brasil, no período de 2000 a 2007.



Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012. (PCM) Paracoccidiodomicose; (Histo) Histoplasmoze, (Cripto) Criptococose e (Cocci) Coccidiodomicose.

Não só no Brasil, como no mundo, existe uma prevalência dos isolados *mating-type* α em amostras clínicas e ambientais. Já em relação aos sorotipos, existe uma predominância do sorotipo A, seguido pelos sorotipos B e D (PAPPALARDO, MELHEM, 2003). Quanto aos genótipos, o VNI se mostra predominante em quase todos os continentes, representando 41% dos casos na América do Norte; 78% na América Central; 64% na América do Sul; 72,6% na África; 45% na Europa e 77% na Ásia. Na Oceania, o genótipo predominante é o VGI, representando 43% dos casos. Na Ásia, representa 15% dos casos, sendo o segundo genótipo mais isolado na região. Nas Américas, o segundo genótipo mais isolado – após o VNI – é o VGII,

representando 26% dos casos na América do Norte, 21% na América do Sul e 11% na América Central (MEYER, TRILLES, 2010).

Nesse sentido, o interesse em pesquisas que envolvam a epidemiologia, patogênese, genômica, metabolômica, imunologia, estratégias terapêuticas, e diversas outras áreas, vem aumentando com o intuito de esclarecer uma série de questionamentos ainda sem respostas. E dessa forma contribuir para um melhor entendimento da fisiopatologia da criptococose, e conseqüentemente, um melhor diagnóstico e prognóstico (DEL POETA, CASADEVALL, 2011).

2.7 TRATAMENTO

A Sociedade Americana de Doenças Infecciosas, em 2000, publicou o primeiro guia de orientação para manejo da criptococose. Já em 2010, esse documento foi atualizado, trazendo orientações para o manejo da meningoencefalite criptocócica em três grupos de risco: pacientes HIV positivos, pacientes transplantados e pacientes HIV negativos não transplantados. Para o primeiro grupo, o tratamento é dado em duas etapas. Inicialmente, é feita a terapia de indução e consolidação, que consiste na administração de anfotericina B associada a 5-fluocitosina por pelo menos duas semanas, seguida de fluconazol por no mínimo oito semanas. A segunda fase, terapia profilática e de manutenção, é feita com o uso de fluconazol ou itraconazol. Deve começar quando a primeira fase está completa, preferencialmente, quando as culturas de líquido são negativas e permanecer até que a terapia antirretroviral tenha sucesso na reconstituição do sistema imune do paciente (ARMSTRONG, 2010; PERFECT et al., 2010).

Para os pacientes transplantados, o tratamento é feito com a administração de anfotericina B lipossomal ou anfotericina B associada a 5-fluocitosina por pelo menos duas semanas, seguida de fluconazol por oito semanas. Em seguida, o fluconazol é administrado em doses menores por 6 a 12 meses. Devido à sua nefrotoxicidade, a anfotericina B deve ser utilizada com cautela nesses pacientes, com monitoramento da função renal (ARMSTRONG, 2010).

No tratamento de pacientes HIV negativos não transplantados, a terapia de indução, para pacientes que apresentam meningoencefalite sem complicações neurológicas e culturas de líquido cefalorraquidiano negativas após duas semanas de tratamento, consiste na administração de anfotericina B associada a 5-fluocitosina por no mínimo quatro semanas. Para aqueles que apresentem complicações neurológicas a terapia pode se estender por seis semanas. A terapia de consolidação é feita com o uso de fluconazol por oito semanas. Após essas duas fases, a terapia de manutenção é iniciada com o fluconazol mantido por 6 a 12 meses (ARMSTRONG, 2010).

Os polienos, a exemplo da anfotericina B, se ligam ao ergosterol na membrana celular, formando poros e, conseqüentemente, levando à morte da célula. Em contraste, a 5-fluocitosina inibe a replicação do DNA e a síntese proteica. Em isolados resistentes aos polienos, nota-se uma quantidade de ergosterol menor que naqueles isolados que são sensíveis. No caso da 5-fluocitosina, uma série de enzimas está envolvida no modo de ação da droga, bem como no mecanismo de resistência do fungo. Apesar da associação dessas drogas representar um dos tratamentos de escolha para a criptococose, em alguns casos há falha terapêutica. Nos últimos anos, algumas diferenças na susceptibilidade aos antifúngicos têm sido percebidas não só entre as duas principais espécies, mas também entre genótipos e sorotipos (ESPINEL-INGROFF et al., 2012).

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a variabilidade genética de amostras do complexo *C. neoformans* isolados de casos de meningite, diagnosticados no Hospital Especializado Couto Maia, Salvador-BA, no período de 2006 a 2011.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar técnica de extração de DNA por fervura de isolados de *Cryptococcus* para utilização direta na Reação em Cadeia da Polimerase
- Determinar o *mating type* de isolados de *Cryptococcus* através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);
- Determinar as variedades de isolados de *Cryptococcus* através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase associada ao Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição (PCR-RFLP);
- Determinar os sorotipos de isolados de *Cryptococcus* através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase associada ao Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição (PCR-RFLP).

4 METODOLOGIA

4.1 MICRO-ORGANISMOS

Foram estudados 94 isolados clínicos oriundos de casos de meningite criptocócica diagnosticados no Hospital Especializado Couto Maia, Salvador-BA no período de 2006 – 2011.

Foram também utilizadas leveduras padrão de referência, representando os oito tipos moleculares e cinco sorotipos, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Micologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ): sendo WM 148, WM 626, WM 628 e WM 629 da espécie *C. neoformans*, e WM 179, WM 178, WM 161 e WM 779 da espécie *C. gattii* (Tabela 01).

Tabela 01. Perfil das cepas de referência.

Cepa	Sorotipo	Variedade
WM 148	A	<i>grubii</i>
WM 626	A	<i>grubii</i>
WM 628	AD	<i>neoformans</i>
WM 629	D	<i>neoformans</i>
WM 179	B	<i>gattii</i>
WM 178	B	<i>gattii</i>
WM 161	B	<i>gattii</i>
WM 779	C	<i>gattii</i>

Fonte: a autora

Todas as leveduras, utilizadas nesse estudo, fazem parte da coleção de cultura do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Clínica (LPMC) da Faculdade de Farmácia da UFBA, as quais se encontram conservadas em duplicatas às temperaturas de -20°C e -80°C, em Caldo Sabouraud dextrose acrescido de 20% de

glicerol. No momento do uso, os isolados foram subcultivados em placas de Ágar Sabouraud Dextrose (ASD – ACUMEDIA) e incubados a 28°C por 48-72 horas em estufa de Demanda Biológica de Oxigênio (BDO), para confirmação da viabilidade e, após o período de incubação, foi realizada a coloração de Gram para confirmação da pureza.

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração do DNA genômico foi procedida por duas técnicas, para posterior comparação de resultados:

Na técnica tradicional descrita por Bolano e colaboradores (2001), modificada pelo grupo de pesquisa do LPMC, após 48 horas de crescimento, três a quatro alçadas da levedura foram transferidas para 2 mL de tampão uréia (Uréia 8M, NaCl 0,5M, Tris 20mM, EDTA 20 mM, SDS 2%, pH 8,0) e, em seguida, incubados por quatro horas sob agitação de 60 rpm à temperatura ambiente. Após o período de incubação, as células foram recuperadas por centrifugação a 4.000 x g por 2 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 400 µL de tampão de lise (SDS 0,5%, sarkosyl 0,5% em TE (EDTA 1 mM, Tris- HCl 1 mM), pH 8,0) e a estes foram adicionados 400 µL de fenol:clorofórmio:álcool isopropílico e 400 µL de pérolas de vidro de 212-300 µM de diâmetro. Então, as células foram submetidas à lise mecânica por três ciclos de agitação a 420 x g por três minutos, com intervalos de três minutos de incubação a 4°C. O extrato resultante foi centrifugado a 1.360 x g por 15 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo de 1,5 mL. A precipitação foi realizada com 400 µL de isopropanol gelado por toda a noite e, então, foram centrifugados por 10 minutos a 6.720 x g. Após descarte do sobrenadante, o sedimento foi lavado com 400 µL de álcool 70% gelado e novamente centrifugado por 10 min a 6.720 x g. O sedimento foi seco por 15 minutos e ressuspenso em 100 µL de TE.

A estimativa da concentração do DNA genômico em 1,0 µL de solução foi realizada por comparação da intensidade de fluorescência das bandas geradas de 100 ng do

marcador de peso molecular do DNA do fago λ (lambda) digerido pela enzima de restrição *HindIII* (INVITROGEN), após corrida em gel de agarose a 0,8%, e utilização dos cálculos da Tabela 02. Após corrida eletroforética, a 80 V por 60 minutos, o gel foi corado com brometo de Etídio, analisado sob luz Ultra Violeta (UV) e fotografado com auxílio de um fotodocumentador (Sistema de Fotodocumentação L-Pix Touch).

Tabela 02. Estimativa de massa dos fragmentos de DNA do fago λ digerido pela enzima *HindIII*.

Fragmento	Tamanho (pb)	Massa estimada (ng)
1	23130	47,7
2	9416	19,4
3	6557	13,5
4	4361	9,0
5	2322	4,7
6	2027	4,2
7	564	1,2
8	125	0,3
Total	48502	100

(pb) pares de base; (ng) nanogramas; (λ) lambda.

Já na técnica descrita por Chaturvedi e colaboradores (2000), também modificada pelo grupo de pesquisa do LPMC, foi transferido todo o crescimento fúngico de uma placa de ASD de 60X15mm, incubada por 48 horas a 28°C, para 4 mL de água Mili-Q estéril. Foi feita uma suspensão fúngica bastante espessa e, após homogeneização em vortex, uma alíquota de 700 μ L dessa suspensão foi transferida para um tubo tipo “eppendorf”, que foi mantido em banho de água fervente por 15 minutos e, em seguida, colocado imediatamente em banho de gelo.

4.3 DETERMINAÇÃO DE *MATING TYPES* E VARIEDADES

4.3.1 Amplificação do gene *MAT* através da Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

De acordo com Chaturverdi e colaboradores (2000), para determinação dos *mating-types* e da ploidia foram utilizados dois pares específicos de iniciadores: para *mating-type* α 5'-CTT CAC TGC CAT CTT CAC CA-3' e 5'-GAC ACA AAG GGT CAT GCC A-3' e para *mating-type* a 5'-CGC CTT CAC TGC TAC CTT CT-3' e 5'-AAC GCA AGA GTA AGT CGG GC-3'.

Foram utilizados 5 µL do sobrenadante da suspensão celular obtida por fervura (Item 4.2) ou 50ng de DNA extraído com fenol/clorofórmio (Item 4.2) para a reação da PCR, os quais foram misturados com 0,068ng de cada iniciador, 3,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 1X Green buffer, 1,25 U da Taq DNA polimerase (GoTaq® - Promega) e água Mili-Q estéril para um volume final de reação de 50µL. Como controle negativo, foi utilizada água Mili-Q no lugar do DNA.

A PCR foi realizada no Termociclador (Bio Rad - Mycycle) utilizando as seguintes condições: um passo inicial de desnaturação a 95°C por três minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto, pareamento a 57,5°C por um minuto, amplificação a 72°C por um minuto, com extensão final a 72°C por sete minutos. Os produtos amplificados foram separados em gel de poliacrilamida a 12% em tampão Tris-borato EDTA (TBE), numa corrida eletroforética de 120 V por uma hora e 15 minutos e, em seguida, observados sob luz UV, após coloração com brometo de Etídio e fotodocumentados no Transiluminador (Locus Biotecnologia – Lpix).

4.3.2 Polimorfismo de Restrição por Tamanho de Fragmento associado à PCR (PCR-RFLP) do gene *MAT*

Após confirmação de amplificação, o produto da PCR foi digerido, separadamente, com as enzimas *EatI*, *AluI*, *HgaI*, *HpaI*, *AcI* e *Tsp45I* (Thermo Scientific) a 37°C “over night”. Os fragmentos gerados foram separados em gel de poliacrilamida a 12%, numa corrida eletroforética em tampão TBE 1X de 120 V por 60 minutos, e o gel foi corado em brometo de Etídio, observado e fotodocumentado utilizando um

sistema de fotodocumentação (Locus Biotecnologia -Pix Touch). Os perfis de restrição dos isolados foram analisados visualmente, comparados com os gerados pelas cepas padrões moleculares de *Cryptococcus* e confirmados pelos mapas de restrição construídos de acordo com o item seguinte.

4.3.2.1 Construção do mapa de restrição

Os sítios de restrição das enzimas *EarI*, *AluI*, *HgaI*, *Tsp45I*, *HpaII* e *AccI* (Tabela 03) foram localizados nas sequências de nucleotídeos do gene *MAT* das cepas dos padrões moleculares obtidas através do acesso ao GenBank WM 148 (AF226887.1), WM 629 (AF226912.1) e WM 178 (AF226936.1).

Tabela 03: Sítios de restrição das enzimas *EarI*, *AluI*, *HgaI*, *Tsp45I*, *HpaII* e *AccI*.

<i>EarI</i>	5'...CTCTTC (N) ₁ ↓ ...3' 3'...GAGAAG (N) ₄ ↑ ...5'
<i>AluI</i>	5'...AG ↓ CT...3' 3'...TC ↑ GA...5'
<i>HgaI</i>	5'...GACGC(N) ₅ ↓ ...3' 3'...CTGCG(N) ₁₀ ↑ ...5'
<i>Tsp45I</i>	5'... ↓ GTSAC...3' 3'...CASTG ↑ ...5'
<i>HpaII</i>	5'...C ↓ CGG...3' 3'...GGC ↑ C...5'
<i>AccI</i>	5'...C ↓ CGC...3' 3'...GGC ↑ G...5'

Fonte: A autora.

4.4 DETERMINAÇÃO DE SOROTIPOS

4.4.1 Amplificação do gene *CAP59* através de PCR

Os cinco sorotipos do complexo *Cryptococcus* foram diferenciados através da técnica de PCR-RFLP, descrita por Enache-Angoulvant e colaboradores (2007) com dois iniciadores de regiões conservadas do gene da cápsula *CAP59*: CAP59F 5'-CCT TGC CGA AGT TCG AAA CG-3' e CAP59R 5'-AAT CGG TGG TTG GAT TCA GTG T-3'.

Foram utilizados 5µL do sobrenadante da suspensão celular obtida por fervura (item 4.2) para a reação da PCR, os quais foram misturados a 1,25µg/µL de cada iniciador, 3,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 1X Green buffer, 1,25 U da Taq DNA polimerase (GoTaq® - Promega) e água Mili-Q estéril para um volume final de reação de 50µL. Como controle negativo, foi utilizada água Mili-Q no lugar do DNA.

A PCR foi realizada numa programação *touchdown* no Termociclador (Bio Rad - Mycycle) utilizando as seguintes condições: um passo inicial de desnaturação a 94°C por sete minutos, seguido de três ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, pareamento a 60°C por 30s, amplificação a 72°C por 30s; três ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, pareamento a 58°C por 30s, amplificação a 72°C por 30s; três ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, pareamento a 55°C por 30s, amplificação a 72°C por 30s; 28 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, pareamento a 52°C por 30s, amplificação a 72°C por 30s; com extensão final a 72°C por 15 minutos. Os produtos amplificados foram separados em gel de poliacrilamida a 8% em tampão TBE juntamente com o controle negativo, numa corrida eletroforética de 100 V por 2 horas e, em seguida, observados sob luz UV, após coloração com brometo de Etídio e fotodocumentados no Transiluminador (Locus Biotecnologia – Lpix).

4.4.2 PCR-RFLP do gene *CAP59*

Após confirmação da amplificação do gene *CAP59*, o produto da PCR foi digerido, separadamente, com as enzimas *BsmFI*, *HpaII* e *AgeI* (Thermo Scientific) a 37°C

“over night”. Nos tubos contendo a enzima *BsmFI*, foram acrescentados também 0,2µL de solução de S-adenosilmetionina (SAM).

Os fragmentos gerados foram separados em gel de poliacrilamida a 8%, numa corrida eletroforética em tampão TBE 1X de 100 V por 1 hora e 30 minutos, e o gel foi corado em brometo de Etídio, observado e fotodocumentado utilizando um sistema de fotodocumentação (Locus Biotecnologia -Pix Touch). Os perfis de restrição dos isolados foram analisados visualmente e comparados com os gerados pelas cepas de referência moleculares de *Cryptococcus*.

**Tabela 04: Sítios de restrição das enzimas
BsmFI, *HpaII* e *AgeI*.**

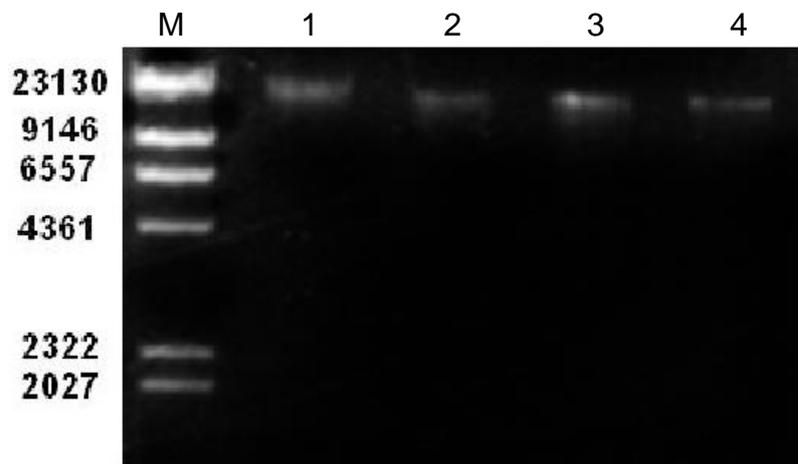
<i>BsmFI</i>	5'...GGGAC (N) ₁₀ ↓...3' 3'...CCCTG (N) ₁₄ ↑...5'
<i>HpaII</i>	5'...C↓CGG...3' 3'...GGC↑C...5'
<i>AgeI</i>	5'...A↓CCGGT...3' 3'...TGGCC↑A...5'

Fonte: A autora.

5 RESULTADOS

A extração de DNA realizada pela técnica descrita por Bolano e colaboradores (2001), modificada, possibilitou obter DNA genômico dos 94 isolados de *Cryptococcus* e das oito cepas de referência com bom rendimento e integridade, cujo tamanho foi condizente com o esperado para DNA genômico (Figura 09). A concentração de DNA foi estimada entre os valores de 13,5 e 47,7 ng/μL.

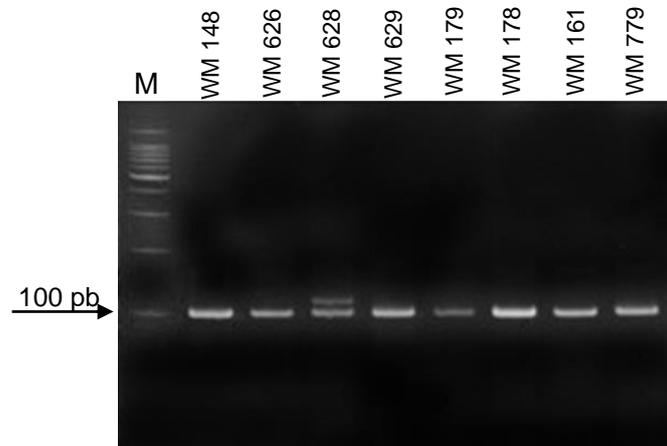
Figura 09. Integridade do DNA genômico de isolados de *Cryptococcus*, em gel de agarose a 0,8%.



Fonte: A autora. (M) Marcador de peso molecular: DNA do fago λ digerido com *Hind*III (Invitrogen). (01 a 04) DNA genômico de isolados de *Cryptococcus*.

Após confirmação da integridade do DNA das cepas de referência, a técnica da PCR para determinação de *mating type* de *Cryptococcus* foi padronizada. Como pode ser observado na Figura 10, todas as cepas de referência geraram uma banda de aproximadamente 100bp e apenas uma cepa, a WM 628, apresentou também uma banda acima desse produto. Com esse resultado, foi possível determinar que sete cepas de referência apresentaram o perfil correspondente ao *mating type* α e que apenas a cepa WM 628 apresenta também o perfil *mating type* a, mostrando a determinação da diploidia como esperado. O controle negativo não apresentou bandas de amplificação.

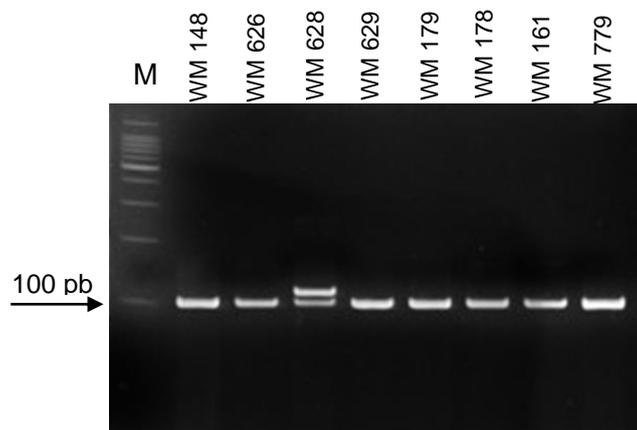
Figura 10: Produtos de amplificação do *mating type* de cepas de referência de *Cryptococcus*, em gel de poliacrilamida a 12%.



Fonte: A autora. (M) marcador de peso molecular: 100pb (Promega).

Após essa padronização, a técnica da PCR para determinação de *mating type* de *Cryptococcus* das cepas de referência foi realizada com o DNA obtido pela técnica de fervura descrita, do qual não é possível ter a concentração determinada. Esses resultados, apresentados na Figura 11, mostram um perfil idêntico ao obtido pela técnica de extração tradicional. Portanto, comparando os resultados da amplificação a partir das duas técnicas de extração de DNA, foi possível chegar a conclusão que não havia diferença entre os perfis gerados e que ambas atendem os objetivos, permitindo a amplificação, sem intercorrências, da sequência de interesse.

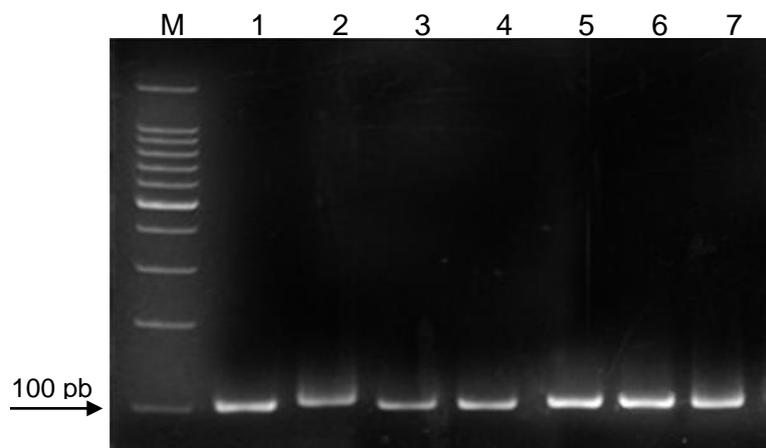
Figura 11: Produtos de amplificação do *mating type* de cepas de referência de *Cryptococcus* a partir da extração por fervura, em gel de poliacrilamida a 12%.



Fonte: A autora. (M) marcador de peso molecular: 100pb (Promega).

A partir destes resultados, a determinação de *mating type* de *Cryptococcus* dos 94 isolados clínicos foi realizada pela amplificação do gene através da técnica da extração pela fervura. A Figura 12 mostra o perfil compatível com *mating type* α , com produto de aproximadamente 100pb, visualizado em 100% dos isolados clínicos testados.

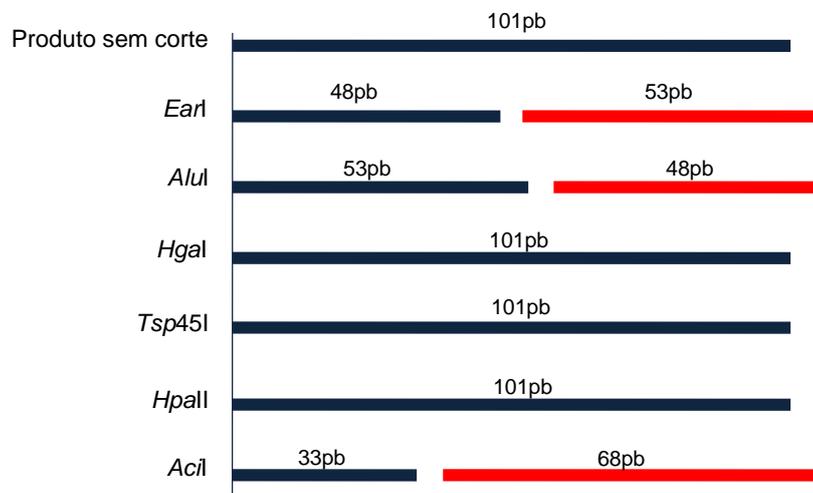
Figura 12: Produtos de amplificação do *mating type* de isolados clínicos de *Cryptococcus*, em gel de poliacrilamida a 12%.



Fonte: A autora. (M) marcador de peso molecular: 100pb (Promega); (1 a 7) isolados clínicos de *Cryptococcus*.

A partir do estudo teórico e a construção do mapa de restrição do gene *MAT* para as cepas de referência, foi possível observar que a variedade *neoformans* (WM 629) não apresentou sítios de restrição para as enzimas *Hgal*, *Tsp45I* e *HpaII*, como mostra a Figura 13. E para as enzimas *EatI*, *AluI* e *AcI* somente um sítio foi observado, produzindo dois fragmentos de aproximadamente 50pb, para as duas primeiras, e para a terceira dois fragmentos de aproximadamente 70 e 30pb, respectivamente.

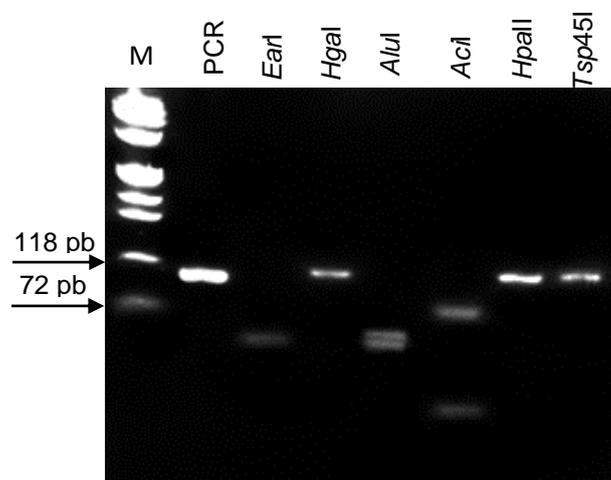
Figura 13: Mapa de restrição da cepa de referência WM 629 (variedade *neoformans*).



Fonte: A autora

O perfil de restrição do produto de PCR da cepa de referência WM 629 (Figura 14) mostra um perfil compatível com o da variedade *neoformans*. Nessa figura, o produto da PCR foi digerido pelas enzimas *EarI* e *AluI* em dois produtos de aproximadamente 50pb e pela enzima *AclI* em dois fragmentos de aproximadamente 70 e 30pb. Nenhum produto de digestão foi visto quando as enzimas *HgaI*, *HpaII* e *Tsp45I* foram utilizadas, pois o que pode ser notado é um fragmento de aproximadamente 100pb.

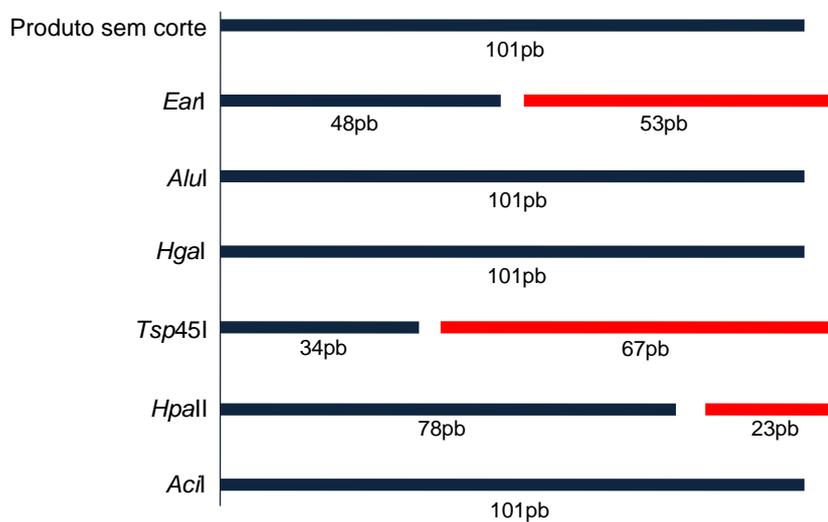
Figura 14: Perfil de RFLP do *mating type* da cepa de referência WM 629 (variedade *neoformans*), em gel de poliacrilamida a 12%.



Fonte: A autora. (M) marcador de peso molecular: DNA do fago x174 digerido com *HaeIII* (Promega).

A Figura 15 mostra o mapa de restrição da cepa de referência WM 148 do gene *MAT*, em que é possível observar que a variedade *grubii* apresentou sítio de restrição para as enzimas *EarI*, *Tsp45I* e *HpaII*. Para a enzima *EarI*, dois fragmentos de aproximadamente 50pb foram produzidos; para *Tsp45I* dois fragmentos de aproximadamente 70 e 30pb e dois fragmentos de aproximadamente 80pb e 20pb para *HpaII*. Nenhum sítio de restrição foi encontrado para as enzimas *AluI*, *HgaI* e *AcI*.

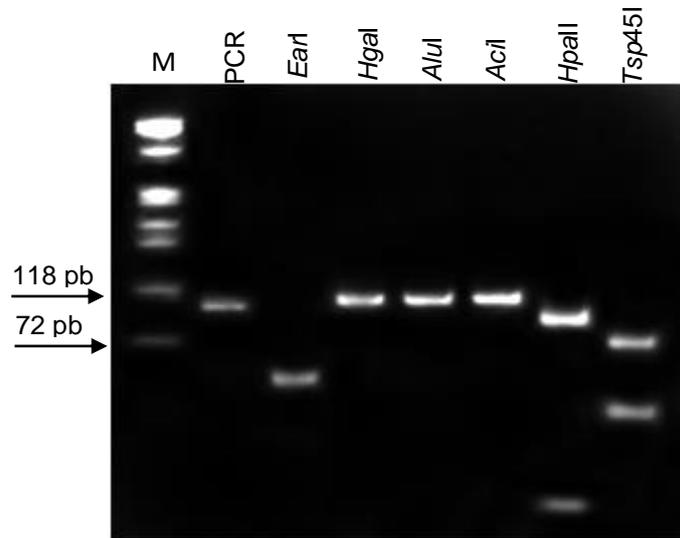
Figura 15: Mapa de restrição da cepa de referência WM 148 (variedade *grubii*).



Fonte: A autora

A Figura 16 mostra o perfil de restrição do produto de PCR da cepa de referência WM 148 (variedade *grubii*), na qual foi possível observar dois fragmentos de aproximadamente 50pb quando a enzima *EarI* foi utilizada; dois fragmentos de aproximadamente 80 e 20pb para a enzima *HpaII* e dois fragmentos de aproximadamente 70 e 30pb para a enzima *Tsp45I* e um produto de restrição com um único fragmento de aproximadamente 100pb para as enzimas *HgaI*, *AluI* e *AcI*. Perfil que caracteriza a variedade *grubii* de acordo com o mapa de restrição construído.

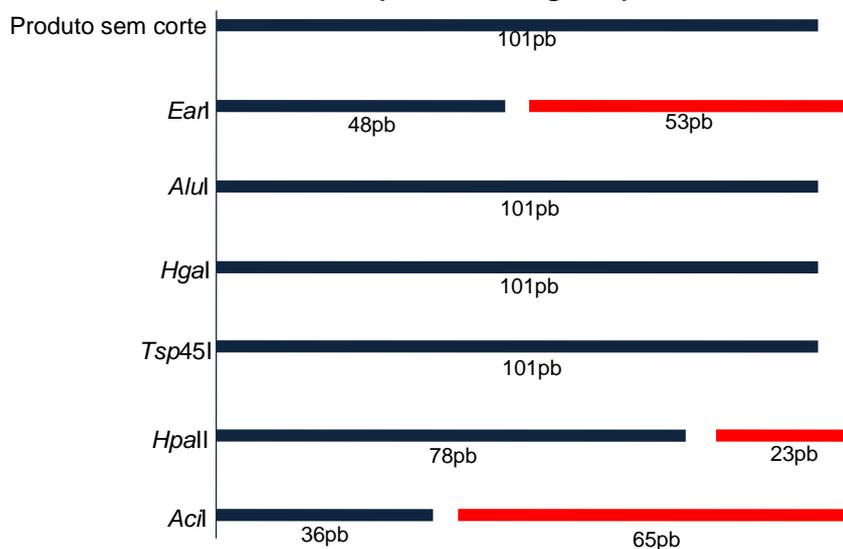
Figura 16: Perfil de RFLP do *mating type* da cepa de referência WM 148 (variedade *grubii*), em gel de poliacrilamida a 12%.



Fonte: A autora. (M) marcador de peso molecular: DNA do fago x174 digerido com *HaeIII* (Promega).

O mapa de restrição do gene *MAT* da cepa de referência WM 178, da variedade *gattii*, é apresentado na Figura 17, onde foi constatado que esta variedade apresentou sítio de restrição para as enzimas *EarI*, *HpaII* e *AclI*. Para a enzima *EarI*, dois fragmentos de aproximadamente 50pb foram produzidos e para as enzimas *HpaII* e *AclI* fragmentos de aproximadamente 70 e 30pb foram registrados.

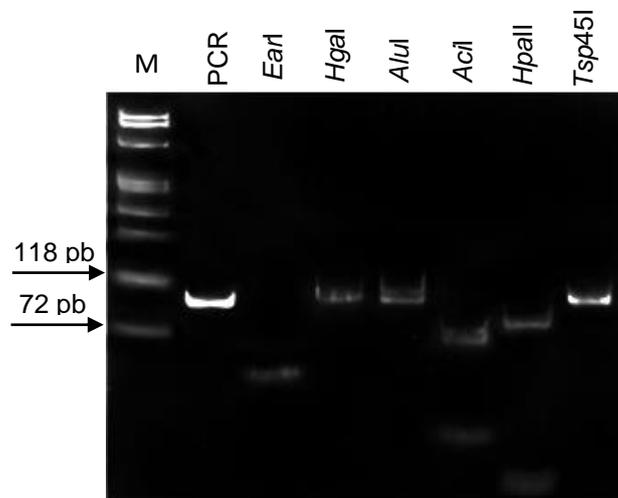
Figura 17: Mapa de restrição da cepa de referência WM 178 (variedade *gattii*).



Fonte: A autora

Já o perfil de restrição do produto de PCR da cepa de referência WM 779 (Figura 18) mostra um padrão compatível com o perfil da variedade *gattii*, pois foi possível observar dois fragmentos de aproximadamente 50pb gerados pela enzima *EarI*, dois fragmentos de 70 e 30pb gerados pela enzima *AcI* e dois fragmentos de aproximadamente 80 e 20pb gerados pela *HpaII*. Nenhum corte foi observado pela restrição das enzimas *HgaI*, *AluI* e *Tsp45I*, pois o fragmento observado foi de aproximadamente 100pb.

Figura 18: Perfil de RFLP do *mating type* da cepa de referência WM 779 (variedade *gattii*), em gel de poliacrilamida a 12%.



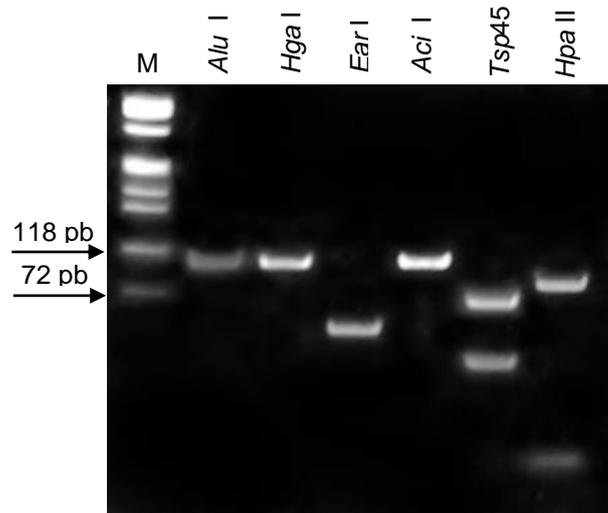
Fonte: A autora. (M) marcador de peso molecular: DNA do fago x174 digerido com *HaeIII* (Promega).

A Figura 19 mostra o perfil de restrição de isolados clínicos compatível com a variedade *grubii*, na qual foi possível observar um fragmento de restrição com de aproximadamente 100pb para as enzimas *AluI*, *HgaI* e *AcI*; dois fragmentos de aproximadamente 70 e 30pb para *Tsp45I*; dois fragmentos de aproximadamente 80 e 20pb para *HpaII* e dois fragmentos sobrepostos de aproximadamente 50pb para *EarI*.

É mostrado na Figura 20 o perfil dos isolados clínicos compatível com a variedade *gattii*, onde nenhum corte foi obtido pela restrição com as enzimas *HgaI*, *AluI* e *Tsp45I*, pois o fragmento observado foi de aproximadamente 100pb; dois fragmentos

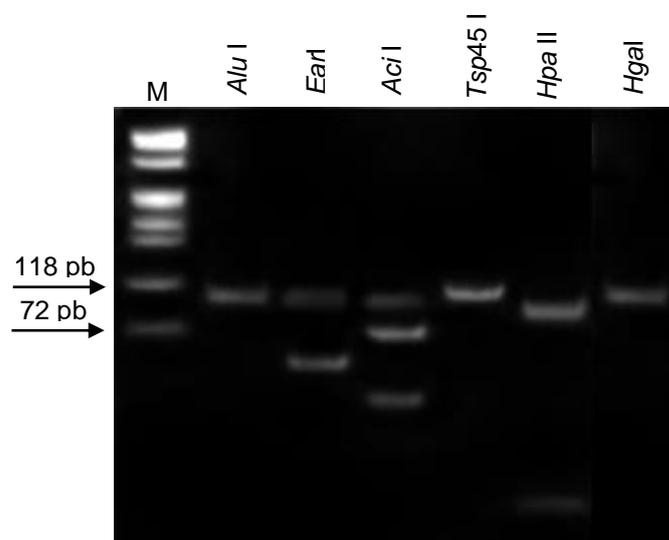
sobrepostos de aproximadamente 50pb para *EarI*, dois fragmentos de 70 e 30pb para *AciI* e dois fragmentos de aproximadamente 80 e 20pb para *HpaII*.

Figura 19: Perfil de RFLP do *mating type* de isolado clínico de *C. neoformans* (variedade *grubii*), em gel de poliacrilamida a 12%.



Fonte: A autora. (M) marcador de peso molecular: DNA do fago x174 digerido com *HaeIII* (Promega).

Figura 20: Perfil de RFLP do *mating type* de isolado clínico de *C. gattii*, em gel de poliacrilamida a 12%.



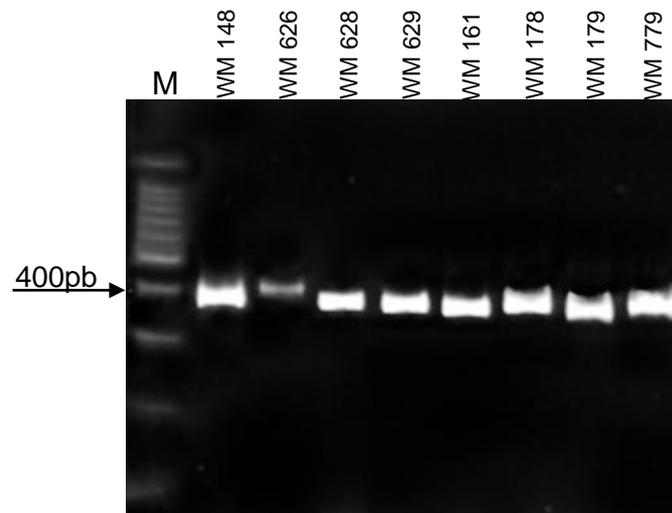
Fonte: A autora. (M) marcador de peso molecular: DNA do fago x174 digerido com *HaeIII* (Promega).

Portanto, de acordo com os perfis apresentados do polimorfismo dos fragmentos de restrição do gene *MAT*, foi possível determinar que 88% (83/94) dos isolados clínicos apresentaram padrão compatível com a variedade *grubii* e que 12% (11/94) com a variedade *gattii*, não sendo encontrado em nenhum isolado perfil compatível com a variedade *neoformans*.

Com relação ao gene *CAP59*, tanto as cepas de referências quanto os isolados clínicos de *Cryptococcus* mostraram o mesmo perfil, com amplificação de uma banda única, cujo tamanho foi de aproximadamente 400pb, como pode ser observado nas Figuras 21 e 22.

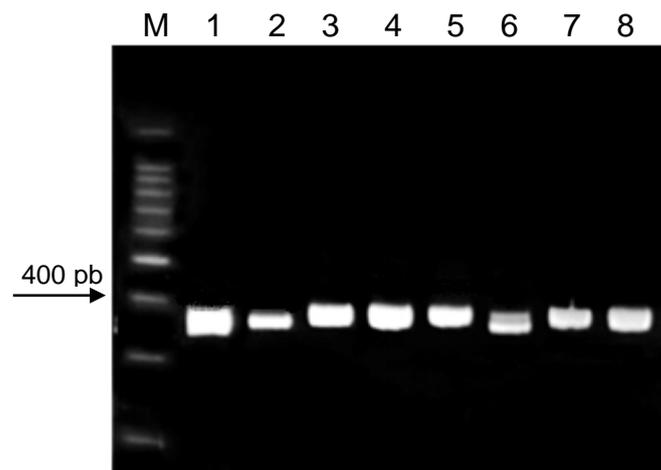
Após restrição dos produtos de PCR do gene *CAP59* das cepas de referência, foi observado que as cepas WM 148 (sorotipo A) e WM 626 (sorotipo A) apresentaram uma banda de aproximadamente 200pb quando restringidas com a enzima *BsmFI* e não apresentaram corte quando restringidas com a enzima *HpaII*. O produto de PCR da cepa WM 629 (sorotipo D), quando restringido com a enzima *BsmFI*, não apresentou corte. No entanto, quando restringido com a enzima *HpaII*, observou-se a presença de uma banda de aproximadamente 200pb e outra um pouco abaixo de 200pb. Os produtos de PCR das cepas WM 161 (sorotipo B), WM 178 (sorotipo B), WM 179 (sorotipo B) e WM 779 (sorotipo C), quando restringidos com a enzima *BsmFI*, não apresentaram corte. Já na restrição desses produtos com a enzima *HpaII*, observou-se a presença de uma banda entre 200 e 300pb e outra de aproximadamente 100pb. Dessa forma, os sorotipos B e C não foram diferenciados com essas duas enzimas (Figura 23).

Figura 21: Produtos de amplificação do gene *CAP59* de cepas de referência de *Cryptococcus*, em gel de poliacrilamida a 8%.



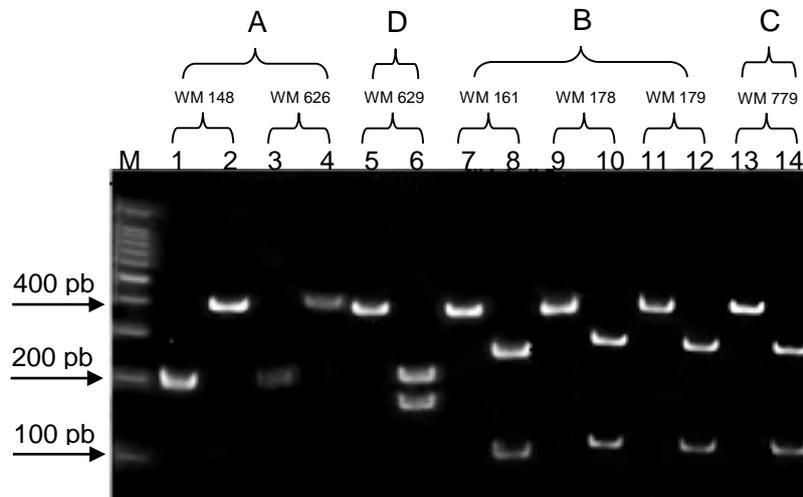
Fonte: A autora. (M) marcador de peso molecular: 100pb (Promega)

Figura 22: Produtos de amplificação do gene *CAP59* de isolados clínicos de *Cryptococcus*, em gel de poliacrilamida a 8%.



Fonte: A autora. (M) marcador de peso molecular: 100pb (Promega);
(1 a 8) isolados clínicos de *Cryptococcus*.

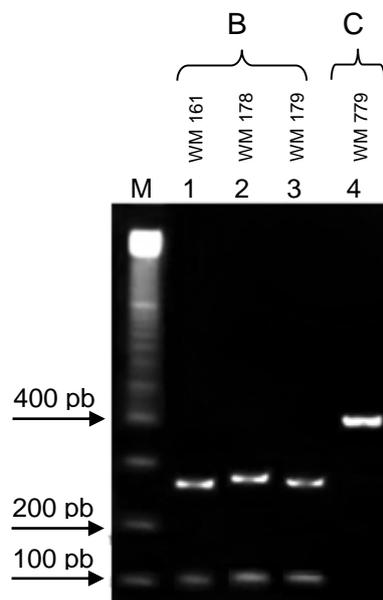
Figura 23: Perfil de RFLP do gene *CAP59* de cepas de referência de *Cryptococcus*, em gel de poliacrilamida a 8%.



Fonte: A autora. (M) marcador de peso molecular: 100 pb (Promega). Números ímpares – restrição com *BsmF* I; números pares – restrição com *Hpa* II.

As cepas de referência do sorotipo B WM 161, WM 178 e WM 179 quando restringidos com *Agel*, mostraram um fragmento de aproximadamente 100pb e outro entre 250 e 300pb; enquanto a cepa de referência do sorotipo C (WM 779) não apresentou nenhum perfil de restrição (Figura 24).

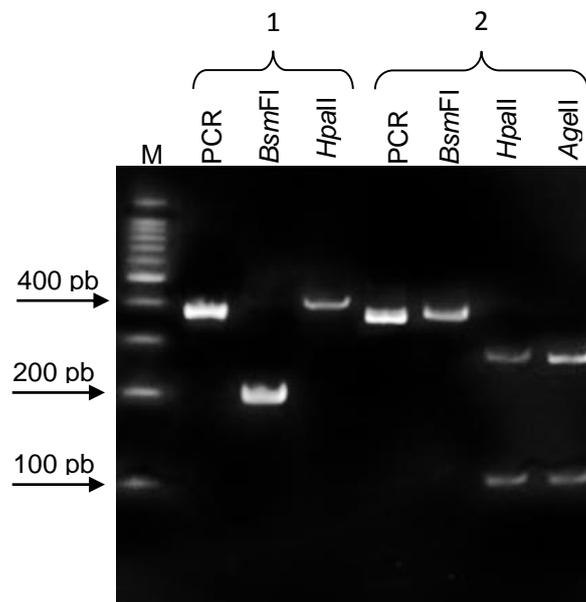
Figura 24: Perfil de RFLP do gene *CAP59* de cepas de referência de *Cryptococcus* com a enzima *Agel*, em gel de poliacrilamida a 8%.



Fonte: A autora. (M) marcador de peso molecular: 100 pb (Promega).

Quando os produtos de amplificação do gene *CAP59* dos isolados clínicos foram restringidos, podemos ver os perfis de restrição na Figura 25. Dos 83 isolados da espécie *C. neoformans*, 100% não apresentou corte com a enzima *HpaII*, mostrando uma banda de aproximadamente 400pb e uma banda de aproximadamente 200pb para a restrição com a enzima *BsmFI*. Já para os 11 isolados da espécie *C. gattii*, o perfil de restrição foi distinto. A enzima *BsmFI* não cortou o produto de PCR, pois apresentou uma banda de 400pb; porém para as enzimas *HpaII* e *AgeI* foram observados dois fragmentos, um de 100pb e um outro entre 250 e 300pb.

Figura 25: Perfil de RFLP do gene *CAP59* de isolados clínicos de *Cryptococcus*, em gel de poliacrilamida a 8%.



Fonte: A autora. (M) marcador de peso molecular: 100 pb (Promega). (1 e 2) Isolados clínicos.

6 DISCUSSÃO

As infecções fúngicas estão emergindo rapidamente, no entanto, ainda se conhece pouco sobre a epidemiologia global, o que dificulta o desenvolvimento de terapias mais eficazes. Leveduras do complexo *C. neoformans* são a segunda maior causa de infecção fúngica oportunista, tanto em humanos como em animais. Apesar da incidência da criptococose ser relativamente baixa em países desenvolvidos, nos países em desenvolvimento o número de casos vem crescendo de forma alarmante, de forma que cepas altamente virulentas emergentes dos países em desenvolvimento vem se espalhando pelo mundo (MEYER, TRILLES, 2010).

Muitos estudos moleculares vêm sendo desenvolvidos com o intuito de ampliar o conhecimento sobre esse patógeno. Dessa forma, alguns trabalhos trazem diferentes protocolos de extração de DNA de leveduras, o que favorece essa ampliação. Varma e Kwon-Chung (1991) descreveram um método de extração por lise química, eliminando algumas etapas realizadas em métodos descritos anteriormente e diminuindo a perda de DNA. Outros protocolos foram descritos, porém seguindo o mesmo princípio (VILGALYS, HESTER, 1990; SANDHU et al., 1995; DEL POETA et al., 1999).

Os resultados de bom rendimento e integridade dos DNAs extraídos pela técnica tradicional apresentados em nosso trabalho corroboram os resultados de Bolano e colaboradores (2001), que melhoraram o rendimento e a qualidade do DNA extraído pela associação da lise química com a lise mecânica. No entanto, trata-se de um método de difícil aplicabilidade em laboratórios que possuem menos recursos, pois necessita de diversos reagentes e diversas etapas. Por outro lado, o método da fervura, que se mostrou mais viável, foi tão eficiente quanto a técnica tradicional de extração, não só em relação à qualidade do DNA extraído, como também em relação ao rendimento, uma vez que, após realização da PCR, apresentou bandas mais intensas que a técnica anterior.

A faixa de concentração de DNA estimada das cepas de referência determinada por nós encontra-se de acordo com a concentração encontrada por Leal (2006), que

variou de 10 a 80ng/ μ L, quando o mesmo procedeu a extração de DNA dos isolados de *Cryptococcus* através da lise por maceração associada a pérolas de vidro. Embora esses resultados sejam de bom rendimento, as técnicas descritas apresentam um procedimento trabalhoso e, nesse sentido, a inovação com técnicas mais rápidas e mais baratas é de extrema importância para o desenvolvimento e viabilidade de novos projetos que envolvem biologia molecular.

As modificações realizadas na técnica de extração de DNA por fervura descrita por Chaturvedi e colaboradores (2000), previamente descritas na metodologia deste trabalho, visaram à redução de custos (pelo menor número de reagentes utilizados) e rápida execução e demonstraram que além de resultados compatíveis com os resultados obtidos pela técnica tradicional de extração de DNA, leveduras do gênero *Cryptococcus*, mesmo apresentando cápsula, não exigem cultivo prévio em meio líquido, nem utilização de solventes orgânicos como o fenol-clorofórmio. Dessa forma, pode ser utilizada facilmente na amplificação de genes deste fungo, tendo como limitação única a impossibilidade de estocar o DNA para utilização posterior. Essa técnica vem sendo utilizada também para extração de DNA de leveduras do gênero *Candida* (RIBEIRO, 2007; MARINHO et al., 2010), apresentando eficiência quando são empregados métodos de diferenciação genotípica, que é o caso do presente trabalho.

Sendo assim, a amplificação do gene *MAT* não mostrou diferença de resultados para as duas metodologias de extração de DNA utilizadas e concordância quando comparados com os mapas de restrição construídos através das sequências das cepas de referência obtidas no GenBank. A totalidade de *mating type* α , com uma predominância notável da variedade *grubii* (88%) nos isolados analisados nesse estudo, corrobora o perfil epidemiológico encontrado em outras regiões do Brasil, assim como em diferentes continentes do mundo (HALLIDAY et al., 1999; OHKUSU et al., 2002; LIAW et al., 2009).

Morrow e colaboradores (2012) através de uma análise genômica de isolados representantes das três variedades mostraram que a variedade *grubii* possui uma alteração na arquitetura genômica, envolvendo seis inversões e uma duplicação. Essas translocações afetam dois genes em particular: o primeiro que codifica uma

nova proteína envolvida no metabolismo da glicose na temperatura corpórea humana e o segundo que codifica um fator de transcrição que modula a produção de melanina. A mutação desses dois genes influencia múltiplos fatores de virulência de *Cryptococcus*, particularmente a habilidade de crescer a 37°C. Isso pode explicar a maior patogenicidade desta variedade, refletida na sua distribuição epidemiológica mundial.

A distribuição de *Cryptococcus* em relação ao *mating type* e as variedades são bem semelhantes em todo o mundo, tanto para isolados clínicos como ambientais. Halliday e colaboradores (1999), num estudo realizado na Austrália com isolados somente da espécie *C. gattii*, demonstraram que de 69 isolados clínicos, incluindo isolados humanos e animais, 68 (98,6%) possuíam *mating type* α . Além desses, foram analisados 130 isolados ambientais, tendo 70% desses o perfil *mating type* α . Jain e colaboradores (2005) realizaram um estudo com 57 isolados clínicos de diversas regiões da Índia, entre eles 51 (89,5%) da variedade *grubii*, 01 (1,7%) da variedade *neoformans* e 05 (8,8%) da variedade *gattii*. Dentre os isolados das variedades *grubii* e *gattii* 98% (56/57) apresentaram *mating type* α .

Feng e colaboradores (2008) realizaram um estudo na China com isolados clínicos e ambientais, compreendendo 45,8% (66/144) da variedade *grubii*, 9,7% (14/144) da variedade *neoformans* e 33,3% (48/144) da variedade *gattii* e 11,1% (16/144) isolados apresentaram o perfil híbrido resultante da união entre as variedades *grubii* e *neoformans*. Dentre todos os isolados estudados 72,9% apresentaram o perfil *mating type* α , 16% apresentaram o perfil *mating type* a e 11,1% apresentaram o perfil diploide, *mating type* α/a . Também na China, outra análise realizada por Liaw e colaboradores (2009), envolvendo 100 isolados clínicos e oito ambientais, mostrou que 100% dos isolados possuíam *mating type* α . Dentre esses, apenas um isolado clínico pertencia à variedade *gattii*, todos os outros, entre clínicos e ambientais, pertenciam a variedade *grubii*. Já em 2011, Miglia e colaboradores realizaram um estudo com 82 isolados clínicos pediátricos na África do Sul, revelando 94% de prevalência do *mating type* α e apenas 6% de *mating type* a. O estudo mostra ainda que 99% dos isolados eram da variedade *grubii* e apenas 1% apresentava o perfil híbrido, não sendo encontrado nenhum isolado da variedade *neoformans*.

No Brasil, um estudo realizado em São Paulo (OHKUSU et al, 2002) mostrou a prevalência do *mating type* α em 100% dos 84 isolados clínicos estudados. Dentre os quais, 89,3% eram da variedade *grubii* e 10,7% da variedade *gattii*, não sendo isolada a variedade *neoformans*. No mesmo estado, Matsumoto e colaboradores (2007) analisaram 47 isolados clínicos de quatro cidades (São José do Rio Preto, Santos, Araraquara e Ribeirão Preto), tendo como resultado 100% dos isolados da variedade *grubii*. Os autores utilizaram o protocolo descrito por Chaturvedi e colaboradores (2000) na íntegra para determinação do *mating type* e obtiveram 100% de prevalência para o *mating type* α .

Ainda na região sudeste, Carvalho e colaboradores (2007) ao analisarem apenas oito isolados de excretas de pombo em Alfenas (Minas Gerais) evidenciaram que todos pertenciam a variedade *grubii* e possuíam *mating type* α . Diferentemente de Moreira e colaboradores (2006) que, trazem um dado bastante incomum, ao realizarem uma análise de 96 isolados clínicos em Uberlândia (Minas Gerais), determinaram um percentual de 92,7% dos isolados como pertencentes à variedade *neoformans* e apenas 7,3% à variedade *gattii*.

Quando a análise é feita em nível de sorotipos, pensava-se na espécie *C. neoformans* variedade *neoformans* com uma subdivisão em dois sorotipos: A e D. No entanto, Franzot e colaboradores (1999), através de técnicas de biologia molecular, perceberam diferenças genotípicas, imunológicas, epidemiológicas e clínicas entre os dois sorotipos. Dessa forma, os autores propuseram que o sorotipo A fosse separado do sorotipo D, tornando-se uma variedade distinta, variedade *grubii*. Essa diferença entre os dois sorotipos é percebida em diversos trabalhos, que mostram a distribuição epidemiológica entre eles e os demais sorotipos. O sorotipo A é ubíquo e prevalente em todos os continentes, causando a maior parte das infecções, enquanto o sorotipo D é pouco relatado na literatura, embora tenha sido frequentemente encontrado, no passado, em alguns países da Europa, Oceania, Ásia e nos Estados Unidos (ROMEO et al., 2012; COGLIATI, 2013; TSENG et al., 2013).

Por muito tempo pensou-se na espécie *C. gattii* como restrita a regiões tropicais e subtropicais. No entanto, o surgimento de genótipos hipervirulentos no surto de

Vancouver (Canadá) e nos Estados Unidos, assim como o aumento de isolados clínicos e ambientais dessa espécie em regiões mais temperadas revelam a capacidade de expansão do domínio geográfico desse patógeno (ROMEO et al., 2012; COGLIATI, 2013). De acordo com Chowdhary e colaboradores (2012), no surto do Canadá houve mais de 350 casos de criptococose humana, sendo 19 entre esses fatais devido à terapia antifúngica bastante agressiva.

Com a interrupção da comercialização do kit de aglutinação Crypto Check (Iatron Laboratories), alguns autores buscaram padronizar novos protocolos para sorotipagem de *Cryptococcus* através de técnicas de biologia molecular. Latouche e colaboradores (2003) mostraram um protocolo de sorotipagem através da amplificação do gene da fosfolipase B (*PLB1*), com subsequente restrição com as enzimas *AvaI* e *HindIII*, obtendo diferenciação entre todos os sorotipos, exceto entre o B e o C. Outra técnica, descrita por Ito-Kuwa e colaboradores (2007), utiliza uma PCR multiplex, envolvendo genes da lacase e da cápsula, e diferenciando todos os sorotipos. A metodologia escolhida para sorotipagem neste trabalho, como já apresentado, foi descrita por Enache-Angoulvant e colaboradores (2007), baseada na amplificação do gene *CAP59*, requerido na biossíntese capsular desta levedura, associada à restrição enzimática.

Nesse estudo mostramos uma prevalência de 88% do sorotipo A, dado que corrobora e enfatiza a disseminação e predominância desse sorotipo em diversas partes do mundo, ficando o sorotipo B como o segundo mais prevalente dentre os isolados descritos na literatura, divergindo apenas do trabalho de Frases e colaboradores (2009), em que o sorotipo B foi o menos prevalente dos quatro existentes, sendo inclusive menos isolado do que o sorotipo híbrido.

Essa prevalência do sorotipo A, seguida pelo sorotipo B é de fato relatada na maioria dos trabalhos que trazem a epidemiologia dos sorotipos de *Cryptococcus* descritos na literatura. Liaw e colaboradores (2009), em Taiwan, mostraram que de 100 isolados clínicos e oito ambientais, apenas um pertencia ao sorotipo B, sendo 99,1% pertencentes ao sorotipo A. Frases e colaboradores (2009) revelaram um perfil mais heterogêneo ao estudarem 97 isolados clínicos e ambientais na Espanha, dentre os quais o sorotipo mais prevalente foi de fato o sorotipo A, com 59,8% dos

isolados, no entanto, seguidos de 13,4% do sorotipo D, 10,3% do sorotipo híbrido AD e apenas 4,4% do sorotipo B, divergindo dos outros trabalhos já mostrados. Outra análise trazida por Romeo e colaboradores (2012), na Itália, mostrou que de 123 isolados ambientais 99,2% foram identificados como do sorotipo A e apenas 0,8% do sorotipo B. Já em 2013, Tseng e colaboradores ao realizarem um trabalho com 219 isolados clínicos oriundos de 20 hospitais de Taiwan, perceberam que 95,9% pertenciam ao sorotipo A, sendo 4,1% pertencentes ao sorotipo B e/ou C.

No Brasil, em 2002, Ohkusu e colaboradores realizaram um estudo com 84 isolados clínicos em São Paulo, dentre os quais 89% eram do sorotipo A e apenas 11% eram do sorotipo B. Casali e colaboradores (2003) realizaram um trabalho com 124 isolados clínicos e ambientais no Rio Grande do Sul, sendo entre eles 84% do sorotipo A, 9% do sorotipo B e 7% do sorotipo D. Já na análise feita por Jain e colaboradores (2005) com 57 isolados clínicos, 89% dos isolados eram do sorotipo A, 9% eram do sorotipo B e apenas 2% do sorotipo D. Em 2007, Carvalho e colaboradores revelaram 100% de prevalência do sorotipo A em um estudo com oito isolados ambientais em São Paulo. E igualmente, Matsumoto e colaboradores (2007), também em São Paulo, obtiveram uma prevalência de 100% do sorotipo A em 47 isolados clínicos estudados. No ano de 2008, um trabalho realizado por Ribeiro e Ngamskulrungrroj, na cidade de Vitória do Espírito Santo, traz a prevalência total do sorotipo A em 10 isolados ambientais.

Nossos resultados corroboram os resultados trazidos por Trilles e colaboradores (2008), que mostram em seu estudo que no Brasil a variedade *grubii* (sorotipo A) representa cerca de 70% das infecções, seguida pela variedade *gattii* (sorotipos B/C), com 28%. A variedade *neoformans*, não encontrada neste trabalho, corresponde a apenas 3% das infecções. De acordo com os autores, o norte e o nordeste brasileiros apresentam o maior número de casos por *C. gattii* do país, sendo o nordeste uma região endêmica do sorotipo B.

Khan e colaboradores (2009) realizaram uma comparação de perfil de sensibilidade ao fluconazol e voriconazol entre isolados ambientais dos sorotipos A e B e constataram uma redução significativa da susceptibilidade aos dois antifúngicos nos isolados do sorotipo B. Da mesma forma, Matos e colaboradores (2012), num estudo

realizado com os mesmos isolados do presente trabalho, mostraram que 15% dos isolados, que eram da espécie *C. gattii*, apresentaram resistência significativa ao fluconazol. Isolados esses que nós determinamos serem do sorotipo B. Dados como esses mostram a importância de se estudar o perfil epidemiológico dessa levedura. Análises que enfatizam as divergências entre os sorotipos de *Cryptococcus* ampliam o conhecimento dessa espécie, contribuindo para a evolução das terapias antifúngicas já estabelecidas, assim como para o surgimento de novas drogas. Além disso, com o surgimento de novas análises, pode-se estabelecer a correlação entre os sorotipos e o prognóstico de cada paciente, resultando na melhor opção terapêutica.

Visto que a criptococose tem sido relatada como a micose sistêmica que mais gera internação hospitalar, tem se tornado um problema de saúde pública de grande importância. Dessa forma, a Secretaria de Vigilância em Saúde está implantando o Programa de Vigilância e Controle das Micoses Sistêmicas com o intuito de determinar a magnitude dessa infecção no Brasil. Com as notificações, será possível conhecer melhor a situação epidemiológica da doença no país e estabelecer a distribuição das espécies em cada região.

7 CONCLUSÃO

1. A caracterização molecular de *Cryptococcus* spp. realizada neste trabalho ampliou o entendimento da distribuição epidemiológica dessa levedura, além de consolidar a importância de se ter um diagnóstico diferencial entre as variedades envolvidas no processo infeccioso.
2. Com os benefícios envolvidos na técnica de extração por fervura, foi possível padronizar no laboratório uma técnica com redução de custo e tempo, viabilizando sua utilização em outros modelos leveduriformes.
3. A amplificação do gene *MAT* permitiu a diferenciação entre os dois *mating types* encontrados nesse gênero.
4. O estudo das sequências das cepas de referência associado à construção dos mapas de restrição do gene *MAT* permitiu observar que a utilização das enzimas *Alu I* e *Tsp45I* é suficiente para determinar as variedades do Complexo *C. neoformans*.
5. A técnica molecular de PCR-RFLP permitiu a discriminação dos cinco sorotipos mais frequentes, representados pelas cepas de referência.

8 PERSPECTIVAS

1. Correlacionar os fatores de virulência com as variedades dos isolados clínicos estudados.
2. Realizar a tipagem molecular pela técnica de PFGE (*Pulse Field Gel Electrophoresis*).
3. Caracterizar os tipos sequenciais dos isolados através da técnica de MLST (*Multilocus Sequence Typing*).
4. Ampliar a caracterização molecular de *Cryptococcus* através da inclusão de novos isolados clínicos.
5. Incluir dados demográficos e clínicos dos pacientes para melhor compreender a distribuição dos perfis moleculares.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, C.; BARBOSA, G. G.; OLIVEIRA, R. V. C.; MORALES, B. P.; WANKE, B.; LAZÉRA, M. S. Techniques for the detection of pathogenic *Cryptococcus* species in wood decay substrata and the evaluation of viability in stored samples. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 126-129, 2013.
- ARAUJO, G. S.; FONSECA, F. L.; PONTES, B.; TORRES, A.; CORDERO, R. J. B.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; CASADEVALL, A.; VIANA, N. B.; NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M. L.; GARCIA, E. S.; SOUZA, W.; FRASES, S. Capsules from pathogenic and non-pathogenic *Cryptococcus* spp. manifest significant differences in structure and ability to protect against phagocytic cells. **Plos One**, v. 7, n. 1, 2012.
- ARMSTRONG, C. IDSA releases guidelines on management of cryptococcal disease. **American Family Physician**, v. 82, n. 6, p. 711-716, 2010.
- BADDLEY, J. W.; SCHAIN, D. C.; GUPTA, A. A.; LODHI, S. A.; KAYLER, L. K.; FRADE, J. P.; LOCKHART, S. R.; CHILLER, T.; BYNON Jr, J. S.; BOWER, W. A. Transmission of *Cryptococcus neoformans* by organ transplantation. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 4, p. 94-98, 2011.
- BANERJEE, P.; HAIDER, M.; TREHAN, V.; MISHRA, B.; THAKUR, A.; DOGRA, V.; LOOMBA, P. *Cryptococcus laurentii* fungemia. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 75-77, 2013.
- BOLANO, A.; STINCHI, S.; PREZIOSI, R.; BISTONI, F.; ALLEGRUCCI, M.; BALDELLI, F.; MARTINI, A.; CARDINALI, G. Rapid methods to extract DNA and RNA from *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Research**, v. 1, n. 3, p. 221-224, 2001.
- BOTES, A.; BOEKHOUT, T.; HAGEN, F.; VISMER, H.; SWART, J.; BOTHA, A. Growth and mating of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* on woody debris. **Microbial Ecology**, v. 57, n. 4, p. 757-765, 2009.
- BOVERS, M.; HAGEN, F.; BOEKHOUT, T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans*–*Cryptococcus gattii* species complex. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, n. 1, p. S4–S12, 2008.
- BUCHANAN, K. L.; MURPHY, J. W. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, p. 71-83, 1998.
- CARVALHO, V. G.; TERCETI, M. S.; DIAS, A. L. T.; PAULA, C. R.; LYON, J. P.; SIQUEIRA, A. M.; FRANCO, M. C. Serotype and mating type characterization of *Cryptococcus neoformans* by multiplex PCR. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 4, p. 207-210, 2007.
- CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. ***Cryptococcus neoformans***. Washington, DC, ASM Press, 1998.

- CASALI, A. K.; GOULART, L. SILVA, L. K. R.; RIBEIRO, A. M.; AMARAL, A. A.; ALVES, S. H.; SCHRANK, A.; MEYER, W.; VAINSTEIN, M. H. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **FEMS Yeast Research**, v. 3, n. 4, p. 405-415, 2003.
- CHATURVEDI, S.; RODEGHIER, B.; FAN, J.; MCCLELLAND, C. M.; WICKES, B. L.; CHATURVEDI, V. Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* MAT α and MAT α pheromones to determine mating type, ploidy, and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 2007-2009, 2000.
- CHENG, M.; CHIOU, C. C.; LIU, Y.; WANG, H.; HSIEH, K. *Cryptococcus laurentii* fungemia in a premature neonate. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1608-1611, 2001.
- CHOWDHARY, A.; RANDHAWA, H. S.; PRAKASH, A.; MEIS, J. F. Environmental prevalence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in India: an update. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 1-6, 2012.
- COGLIATI, M. Global molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: an atlas of the molecular types. **Scientifica**, v. 2013, p. 1-23, 2013.
- COUTINHO, G. **Fatores de virulência e resistência a antifúngicos de amostras clínicas e ambientais de *Cryptococcus neoformans***. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências). Programa de Pós-Graduação em Ciências, Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, 2006.
- COX, G. M.; MUKHERJEE, J.; COLE, G. T.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 443-448, 2000.
- CRIPTOCOCOSE, 2009. Disponível em: <
<http://criptococosenafenfermagem.blogspot.com.br/>>. Acesso em: 14 abr. 2013, il. color.
- DEL POETA, M.; CASADEVALL, A. Ten challenges on *Cryptococcus* and cryptococcosis. **Mycopathologia**, v. 173, n. 5-6, p. 303-310, 2011.
- DOMINIC, R. M. S.; PRASHANTH, H. V.; SHENOY, S.; BALIGA, S. Diagnostic value of latex agglutination in cryptococcal meningitis. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 1, n. 2, p. 67-68, 2009.
- ENACHE-ANGOULVANT, A.; CHANDENIER, J.; SYMOENS, F.; LACUBE, P.; BOLOGNINI, J.; DOUCHET, C.; POIROT, J. L.; HENNEQUIN, C. Molecular identification of *Cryptococcus neoformans* serotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1261-1265, 2007.
- ESPINEL-INGROFF, A.; CHOWDHARY, A.; CUENCA-ESTRELLA, M.; FOTHERGILL, A.; FULLER, J.; HAGEN, F.; GOVENDER, N.; GUARRO, J.; JOHNSON, E.; LASS-FLORL, C.; LOCKHART, S. R.; MARTINS, M. A.; MEIS, J. F.;

MELHEM, M. S. C.; OSTROSKY-SEICHNER, L.; PELAEZ, T.; PFALLER, M. A.; SCHELL, W. A.; TRILLES, L.; KIDD, S.; TURNIDGE, J. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and flucytosine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 3107-3113, 2012.

FENG, X.; YAO, Z.; REN, D.; LIAO, W. Simultaneous identification of molecular and mating types within the *Cryptococcus* species complex by PCR-RFLP analysis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 12, p. 1481-1490, 2008.

FINDLEY, K.; RODRIGUEZ-CARRES, M.; METIN, B.; KROISS, J.; FONSECA, A.; VILGALYS, R.; HEITMAN, J. Phylogeny and phenotypic characterization of pathogenic *Cryptococcus* species and closely related saprobic taxa in the Tremellales. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 3, p. 353-361, 2009.

FLORIO, A. D.; FERRARI, S.; DE CAROLIS, E.; TORELLI, R.; FADDA, G.; SANGUINETTI, M.; SANGIARD, D.; POSTERARO, B. Genome-wide expression profiling of the response to short-term exposure to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* serotype A. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 97, p. 1-13, 2011.

FRASES, S.; PONTES, B.; NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M. L.; VIANA, N. B.; CASADEVALL, A. The elastic properties of the *Cryptococcus neoformans* capsule. **Biophysical Journal**, v. 97, n. 4, p. 937-945, 2009.

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. 4, p. 838-840, 1999.

FUN WITH MICROBIOLOGY, 2010. Disponível em: <<http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com.br/2010/09/cryptococcus-neoformans.html>>. Acesso em: 14 abr. 2013, il. color.

GAZZONI, A. F.; SEVERO, C. B.; SALLES, E. F.; SEVERO, L. C. Histopathology, serology and cultures in the diagnosis of cryptococcosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 5, p. 255-259, 2009.

HALLIDAY, C. L.; BUI, T.; KROCKENBERGER, M.; MALIK, R.; ELLIS, D. H.; CARTER, D. A. Presence of α and a mating types in environmental and clinical collections of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* strains from Australia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 9, p. 2920-2926, 1999.

ITO-KUWA, S.; NAKAMURA, K.; AOKI, S.; VIDOTTO, V. Serotype identification of *Cryptococcus neoformans* by multiplex PCR. **Mycoses**, v. 50, n. 4, p. 277-281, 2007.

ITO-KUWA, S.; NAKAMURA, K.; VALDERRAMA, B.; AOKI, S.; VIDOTTO, V.; OSAFUNE, T. Diversity of laccase among *Cryptococcus neoformans* serotypes. **Microbiology and Immunology**, v. 52, n. 10, p. 492-498, 2008.

JAIN, N.; WICKES, B. L.; KELLER, S. M.; FU, J.; CASADEVALL, A.; JAIN, P.; RAGAN, M. A.; BANERJEE, U.; FRIES, B. C. Molecular epidemiology of clinical *Cryptococcus neoformans* strains from India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5733-5742, 2005.

KATSU, M.; KIDD, S.; ANDO, A.; MORETTI-BRANCHINI, M. L.; MIKAMI, Y.; NISHIMURA, K.; MEYER, W. The internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene show extensive diversity among isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 4–5, p. 377–388, 2004.

KHAN, Z. U.; RANDHAWA, H. S.; CHEHADEH, W.; CHOWDHARY, A.; KOWSHIK, T.; CHANDY, R. *Cryptococcus neoformans* serotype A and *Cryptococcus gattii* serotype B isolates differ in their susceptibilities to fluconazole and voriconazole. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 6, p. 559-563, 2009.

KOZUBOWSKI, L.; LEE, S. C.; HEITMAN, J.; Signaling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 370-380, 2009.

KOZUBOWSKI, L.; HEITMAN, J. Profiling a killer, the development of *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 1, p. 78-94, 2012.

KRONSTAD, J. W.; ATTARIAN, R.; CADIEUX, B.; CHOI, J.; D'SOUZA, C. A.; GRIFFITHS, E. J.; GEDDES, J. M.; HU, G.; JUNG, W. H.; KRETSCHMER, M.; SAIKIA, S.; WANG, J. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 193-203, 2011, il. color.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts – a taxonomic study**. 4 ed. Holanda: Elsevier, 1998.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Distribution of α and a mating-types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. **American Journal of Epidemiology**, v. 108, n. 4, p. 337-340, 1978.

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

LACAZ, C. S.; HEINS-VACCARI, E. M.; HERNÁNDEZ-ARRIAGADA, G. L.; MARTINS, E. L.; PREARO, C. A. L.; CORIM, S. M.; MARTINS, M. A. Primary cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype B in a immunocompetent patient. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 4, p. 225-228, 2002.

LATOUCHE, G. N.; HUYNH, M.; SORRELL, T. C.; MEYER, W. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the phospholipase B (PLB1) gene for subtyping of *Cryptococcus neoformans* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 2080-2086, 2003.

LEAL, A. N. **Diferenciação das espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* utilizando a metodologia de PCR multiplex e determinação do perfil epidemiológico de pacientes com meningite criptocócica.** 2006. 100f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, 2006.

LEE, Y. A.; KIM, H. J.; LEE, T. W.; KIM, M. J.; LEE, M. H.; LEE, J. H.; IHM, C. G. First report of *Cryptococcus albidus* – induced disseminates cryptococcosis in a renal transplant recipient. **The Korean Journal of Internal Medicine**, v. 19, n. 1, p. 53-57, 2004.

LENGELER, K. B.; COX, G. M.; HETMAN, J. Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating type locus. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 1, p. 115-122, 2001.

LIAW, S. J.; WU, H. C.; HSUEH, P. R. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan - serotypes, mating types, molecular types, virulence factors, and antifungal susceptibility. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 6, p. 696-703, 2009.

LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 69–105, 2006.

LIN, X.; NIELSEN, K.; PATEL, S.; HEITMAN, J. Impact of mating type, serotype, and ploidy on the virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 7, p. 2923-2938, 2008.

MARINHO, S. A.; TEIXEIRA, A. B.; SANTOS, O. S.; CAZANOVA, R. F.; FERREIRA, C. A. S.; CHERUBINI, K.; OLIVEIRA, S. D. Identification of *Candida* spp. by phenotypic tests and PCR. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 286-294, 2010.

MATOS, C.S.; ANDRADE, A. S.; OLIVEIRA, N. S.; BARROS, T. F. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus* spp. in Bahia, Brazil: molecular types and antifungal susceptibilities. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, n. 7, p. 1647-1652, 2012.

MATSUMOTO, M. T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; BAEZA, L. C.; MELHEM, M. S. C.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Genotyping, serotyping and determination of mating-type of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from São Paulo state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 1, p. 41-47, 2007.

MCFADDEN, D.; ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A. The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 11, p. 497-505, 2006.

METIN, B.; FINDLEY, K.; HEITMAN, J. The mating locus type (MAT) and sexual reproduction of *Cryptococcus heveanensis*: insights into the evolution of sex and sex-determining chromosomal regions in Fungi. **Plos Genetics**, v. 6, n. 5, p. 1-19, 2010.

MEYER, W.; MARSZEWSKA, K.; AMIRMOSTOFIAN, M.; IGREJA, R. P.; HARDTKE, C.; METHLING, K.; VIVIANI, M. A.; CHINDAMPORN, A.; SUKROON-GREUNG, S.; JOHN, M. A.; ELLIS, D. H.; SORRELL, T. C. 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.; TRILLES, L. Genotyping of the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex. **Australian Biochemist**, v. 41, n. 1, p. 11-15, 2010.

MIGLIA, K. J.; GOVENDER, N. P.; ROSSOUW, J.; MEIRING, S.; MITCHELL, T. G.; GROUP FOR ENTERIC, RESPIRATORY, AND MENINGEAL DISEASE SURVEILLANCE IN SOUTH AFRICA. Analyses of pediatric isolates of *Cryptococcus neoformans* from South Africa. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 307-314, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância Epidemiológica da Criptococose**. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2012.

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

MOREIRA, T. A.; FERREIRA, M. S.; RIBAS, R. M.; BORGES, A. S. Criptococose: estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 255-258, 2006.

MORROW, C. A.; LEE, I. R.; CHOW, E. W. L.; ORMEROD, K. L.; GOLDINGER, A.; BYRNES III, E. J.; NIELSEN, K.; HEITMAN, J.; SCHIRRA, H. J.; FRASER, J. A. A unique chromosomal rearrangement in the *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* type strain enhances key phenotypes associated with virulence. **MBio**, v. 3, n. 2, p. 1-11, 2012.

NEGRONI, R. Cryptococcosis. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 6, p. 599-609, 2012.

ODOM, A.; MUIR, S.; LIM, E.; TOFFALETTI, D. L.; PERFECT, J.; HEITMAN, J. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **The EMBO Journal**, v. 16, n. 10, p. 2576-2589, 1997.

OHKUSU, M.; TANGONAN, N.; TAKEO, K.; KISHIDA, E.; OHKUBO, M.; AOKI, S.; NAKAMURA, K.; FUJII, T.; SIQUEIRA, I. C.; MACIEL, E. A. P.; SAKABE, S.; ALMEIDA, G. M. D.; HEINS-VACCARI, E. M.; LACAZ, C. S. Serotype, mating type and ploidy of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from patients in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 6, p. 299-302, 2002.

OLSZEWSKI, M. A.; NOVERR, M. C.; CHEN, G.; TOEWS, G. B.; COX, G. M.; PERFECT, J. R.; HUFFNAGLE, G. B. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. **American Journal of Pathology**, v. 164, n. 5, p. 1761-1771, 2004.

OSTERHOLZER, J. J.; SURANA, R.; MILAM, J. E.; MONTANO, G. T.; CHEN, G.; SONSTEIN, J.; CURTIS, J. L.; HUFFNAGLE, G. B.; TOEWS, G. B.; OLSZEWSKI, M. A. Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. **American Journal of Pathology**, v. 174, n. 3, p. 932-943, 2009.

PAPPALARDO, M. C. S.M.; MELHEM, M. S. C. Cryptococcosis: a review of the brazilian experience for the disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 6, p. 299-305, 2003.

PASA, C. R. **Tipagem molecular e suscetibilidade antifúngica de *Cryptococcus* isolados de pacientes em hospital universitário com investigação domiciliar.** 2011. 124f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento). Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS, 2011.

PASCHOAL, R. C.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. C.; MELHEM, M. S. C.; DIAS, A. L. T.; PAULA, C. R. Neurocryptococcosis: diagnosis by PCR method. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 4, p. 203-207, 2004.

PEDROSO, R. S.; CANDIDO, R. C. Diagnóstico laboratorial da criptococose. **NewsLab**, v. 14, p. 94-102, 2006.

PERFECT, J. R.; DISMUKES, W. E.; DROMER, F.; GOLDMAN, D. L.; GRAYBILL, J. R.; HAMIL, R. J.; HARRISON, T. S.; LARSEN, R. A.; LORTHOLARY, O.; NGUYEN, M.; PAPPAS, P. G.; POWDERLY, W. G.; SINGH, N.; SOBEL, J. D.; SORREL, T. C. 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.

RIBEIRO, P. M. **Identificação de *Candida dubliniensis* em cepas da micoteca da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP.** 2007. 114p. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal). Área de Concentração em Biopatologia Bucal, Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, SP, 2007.

RIBEIRO, M. A.; NGAMSKULRUNGROJ, P. Molecular characterization of environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in Vitoria, ES, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 6, p. 315-320, 2008.

ROMEO, O.; SCORDINO, F.; CHILLEMI, V.; CRISEO, G. *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* species complex in Southern Italy: an overview on the environmental diffusion of serotypes, genotypes and mating-types. **Mycopathologia**, v. 174, n. 4, p. 283-291, 2012.

SAHA, D. C.; XESS, I.; BISWAS, A.; BHOWMIK, D. M.; PADMA, M. V. Detection of *Cryptococcus* by conventional, serological and molecular methods. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 1098-1105, 2009.

SANDHU, G. S.; KLINE, B. C.; STOCKMAN, L.; ROBERTS, G. D. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 11, p. 2913-2919, 1995.

SANTOS, M. S.; SOUZA, E. S.; JUNIOR, R. M. S.; TALHARI, S.; SOUZA, J. V. B. Identification of fungemia agents using the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 8, p. 712-716, 2010.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SOUZA, L. K. H.; FERNANDES, O. F. L.; KOBAYASHI, C. C. B. A.; PASSOS, X. S.; COSTA, C. R.; LEMOS, J. A.; SOUZA-JUNIOR, A. H.; SILVA, M. R. R. Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Goiânia city, Goiás, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 5, p. 253-256, 2005.

SUN, H.; WAGENER, M. M.; SINGH, N. Cryptococcosis in solid-organ, hematopoietic stem cell, and tissue transplant recipients: evidence-based evolving trends. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 11, p. 1566-1576, 2009.

SUN, H.; ALEXANDER, B. D.; LORTHOLARY, O.; DROMER, F.; FORREST, G. N.; LYON, G. M.; SOMANI, J.; GUPTA, K. L.; DEL BUSTO, R.; PRUETT, T. L.; SIFRI, C. D.; LIMAYE, A. P.; JOHN, G. T.; KLINTMALM, G. B.; PURSELL, K.; STOSOR, V.; MORRIS, M. I.; DOWDY, L. A.; MUNOZ, P.; KALIL, A. C.; GARCIA-DIAZ, J.; ORLOFF, S. L.; HOUSE, A. A.; HOUSTON, S. H.; WRAY, D.; HUPRIKAR, S.; JOHNSON, L. B.; HUMAR, A.; RAZONABLE, R. R.; FISHER, R. A.; HUSAIN, S.; WAGENER, M. M.; SINGH, N.; CRYPTOCOCCAL COLLABORATIVE TRANSPLANT STUDY GROUP. Unrecognized pretransplant and donor-derived cryptococcal disease in organ transplant recipients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 9, p. 1062-1069, 2010.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TRILLES, L.; LAZÉRA, M. S.; WANKE, B.; OLIVEIRA, R. V.; BARBOSA, G. G.; NISHIKAWA, M. M.; MORALES, B. P.; MEYER, W. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 455-462, 2008.

TSENG, H.; LIU, C.; HO, M.; LU, P.; LO, H.; LIN, Y.; CHO, W.; CHEN, Y.; THE TAIWAN INFECTIOUS DISEASES STUDY NETWORK FOR CRYPTOCOCCOSIS. Microbiological, epidemiological, and clinical characteristics and outcomes of patients with cryptococcosis in Taiwan, 1997-2010. **Plos One**, v. 8, n. 4, p. 1-10, 2013.

UNIVERSITY OF ADELAIDE. Mycology Online. Disponível em:
<<http://www.mycology.adelaide.edu.au>>. Acesso em: 14 abr. 2012, il. color.

VARMA, A.; KWON-CHUNG, K. J. Rapid method to extract DNA from *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 810-812, 1991.

VILGALYS, R.; HESTER, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 8, p. 4238-4246, 1990.

XUE, C.; TADA, Y.; DONG, X.; HEITMAN, J. The human fungal pathogen *Cryptococcus* can complete its sexual cycle during a pathogenic association with plants. **Cell Host & Microbe**, v.1, n. 4, p. 263-273, 2007.