



Bibiana Paula Dambrós

**Variabilidade genética de *Cryptococcus neoformans* isolado de
pacientes HIV positivos atendidos no Hospital Nereu Ramos de
Florianópolis, Santa Catarina.**

Florianópolis, dezembro de 2005

BIBIANA PAULA DAMBRÓS

**Variabilidade genética de *Cryptococcus neoformans* isolado de pacientes
HIV positivos atendidos no Hospital Nereu Ramos de Florianópolis, Santa
Catarina.**

Dissertação de Mestrado apresentada
como requisito parcial à obtenção do
grau de mestre em Biotecnologia,
Universidade Federal de Santa
Catarina, Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Mário Steindel

Co-Orientador: Prof. Dr. Jairo Santos

Florianópolis

2005

Dambrós, Bibiana Paula

VARIABILIDADE GENÉTICA DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* ISOLADO DE PACIENTES HIV POSITIVOS ATENDIDOS NO HOSPITAL NEREU RAMOS DE FLORIANÓPOLIS, SANTA CATARINA. / Bibiana Paula Dambrós - Florianópolis, 2005.

Dissertação (Mestrado-Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina

1. *C. neoformans*. 2. caracterização molecular. 3. sorotipos. 4. HIV.

Dedico este trabalho a minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos ao meu orientador, Dr. Mário Steindel, pelos ensinamentos, pelas orientações, pelas concordâncias e discordâncias que me fizeram crescer a cada dia ao longo destes 7 anos de formação acadêmica e pesquisa. Principalmente agradeço pelos estímulos, confiança, convivência, respeito, dedicação, amizade e carinho. Obrigada por tudo Mário!!! Um grande beijo e abraço!!!

Ao Dr. Edmundo Carlos Grisard, por todos os ensinamentos, conselhos, conversas, carinho e confiança. Principalmente por todas as cervejas bem geladas!!! Obrigada!!! Um grande beijo e abraço!!!

Ao meu co-orientador Jairo Ivo Santos pela colaboração.

À Semiramis, Bioquímica do LACEN, pela disponibilidade das amostras.

À Dra Marilene Henning Vaistein pela ajuda no envio das amostras padrões e pelas dicas.

Agradeço em especial a minha mãe (Vera) aos meus irmãos Fabíola, Cristiane e Wilmor pelo apoio, amor, força, carinho e compreensão pelas ausências nestes anos de estudo. Ao meu sobrinho (Gabriel), por existir.

Ao meu Pai (Sérgio), minha “boadrasta” (Marinez) e meu irmão e afiliado (Ricardo) pelo apoio e compreensão.

À Carolina pelo apoio, carinho, amizade e compreensão nestes 2 anos!!!

À Iriane (Ane) pelo apoio e amizade!!! Moniquinha e Rúbia pelo carinho!!!

À s amigas Cristiane (pelas conversas e desabafos), Milene (minhoca, por estar sempre no lugar certo, na hora exata!!), Gi e Patrícia (pelos géis e pela paciência), Priscila, Fabiana,

Daniele Bibas, Dani (ruiva), Letícia, Ethel, Alessandra, Juliana, Deise, Jana, Diogo, pelo convívio agradável, conversas e risadas.

Aos amigos Glauber (pela colaboração, amizade e conversas!!!) e Rodrigo pela amizade, paciência e carinho!!!

Aos professores Aguinaldo (pela correção e conversas) e Carlos Zanetti pela amizade e conversas.

Aos professores Marília, Orlando, Sônia pela convivência e conversas.

A todos os professores, servidores e alunos de todos os laboratórios.

À coordenação e funcionários do Programa de Mestrado em Biotecnologia pela colaboração.

**"Nunca ande apenas pelos
caminhos traçados, pois eles
conduzem somente até aonde os
outros já foram."**

Alexander Graham Bell

RESUMO

A criptococose é uma infecção fúngica de distribuição mundial causada pela levedura encapsulada *Cryptococcus neoformans*. Esta doença é de grande importância em pacientes imunocomprometidos, podendo também acometer indivíduos imunocompetentes. A infecção pelo *C. neoformans* resulta da inalação basidiósporos, conídios ou blastoconídios pouco capsulados (4 a 5µm) presentes no ambiente, podendo inicialmente causar infecção sintomática ou assintomática na área subpleural dos pulmões, ser erradicada ou ainda permanecer dentro de um granuloma em estado latente. Este patógeno pode ser classificado em três variedades: *C. neoformans* var *grubii* (sorotipo A), com distribuição mundial, *C. neoformans* var *neoformans* (sorotipo D) freqüentemente encontrado na Europa e América do Sul e *C. neoformans* var *gattii* (sorotipos B e C) regiões tropicais e subtropicais e o híbrido sorotipo AD. No Brasil, as três variedades são os agentes etiológicos da criptococose em humanos. O objetivo deste estudo foi avaliar a variabilidade genética de amostras de *C. neoformans* isoladas de pacientes HIV positivos atendidos no Hospital Nereu Ramos de Florianópolis, Santa Catarina. Os 35 isolados clínicos analisados foram caracterizados como *C. neoformans* var *grubii*, sorotipo A, através da metodologia de PCR-RFLP do fragmento de 597 pb do gene CAP59. A PCR-*fingerprinting* com o iniciador M13 agrupou 34 isolados clínicos no padrão molecular VNI e uma amostra apresentou perfil distinto. A caracterização das 35 amostras através da técnica de RAPD utilizando 4 iniciadores aleatórios 3303, 3304, 3306 e 3307 mostrou baixa variabilidade genética das amostras. O sequenciamento do fragmento de 597 pb do gene CAP59 de duas amostras representativas juntamente com o padrão sorotipo A LMM794, mostrou uma homologia de 96% na seqüência nucleotídica e de aminoácidos predita com as seqüências de sorotipo A e AD depositadas no GenBank. Nossos resultados adicionam novas informações sobre a Biologia Molecular do *C. neoformans* no Estado de Santa Catarina.

Palavras Chaves: *Cryptococcus neoformans*, caracterização molecular, sorotipos, pacientes HIV.

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans is an encapsulated yeast-like fungus of worldwide distribution and the etiologic agent of cryptococcosis. This disease is a common opportunistic infection among patients with immunosuppression and in apparently immunocompetent individuals. The infection is acquired by the inhalation of infectious propagules present in the environment. Therefore, the primary settlement of the pathogens is in the lungs, a site from which dissemination may occur. This fungus is classified in three varieties *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A) of worldwide distribution, *C. neoformans* var. *neoformans* (serotype D) isolated rather frequently in Europe and South America, *C. neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C) isolated in tropical and subtropical regions and a hybrid serotype AD. In Brazil, these three distinct *neoformans* varieties are the main casual agents of human cryptococcosis. The main goal of this dissertation is to study the genetic variability of *C. neoformans* samples isolated from patients attended at the Hospital Nereu Ramos Hospital, Florianópolis, Santa Catarina state, Brazil. Thirty-five clinical isolates were characterized, based on morphological and molecular data. All 35 clinical isolates were identified as *C. neoformans* var. *grubii*, representing serotype A, by PCR-RFLP analysis of CAP59 gene 597pb restriction fragment. A PCR-fingerprinting with the microsatellite-specific primer M13 grouped 34 isolates into the molecular type VNI and one showed distinct profile. The genetic variability among *C. neoformans* isolates were studied using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. The four arbitrary polymerase chain reaction primers used in this study detected low genetic variability among the samples. The CAP59 nucleotide and predicted amino acid sequences analysis of two representative samples and serotype pattern A LMM794 of *C. neoformans* showed more than 96% similarity among serotype A and AD deposited in GenBank database. Our results add considerable new information to the available data on molecular biology of *C. neoformans* in the Santa Catarina State, Brazil.

Key words: *Cryptococcus neoformans*, molecular characterization, serotypes, HIV

LISTA DE FIGURAS

- Figura-1.** Representação esquemática do ciclo vital de *Cryptococcus neoformans*. À direita, reprodução sexuada e a esquerda reprodução assexuada. Adaptado de Lengeler et al. (2000). **03**
- Figura-2.** Gel em agarose 1,5% corado pelo brometo de etídio representativo da extração de DNA genômico das amostras de *Cryptococcus neoformans* utilizando o protocolo N° 12. 1- Vetor fago lambda clivado com *HindIII*[®]; 2 – controle positivo LMM794 DNA; 3- am.26; 4- am.39; 5- am.77; 6- am.45. **44**
- Figura-3.** Gel em agarose 1,5% representativo dos produtos de amplificação do gene CAP59 dos isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* utilizando oligonucleotídeos CAP59F e CAP59R. 1- Vetor PUC18 clivado com endonuclease *HaeIII*[®]; 2- controle positivo LMM794 DNA; 3- am.39; 4- am.41; 5- am.42; 6- am.45; 7- am.48; 8- controle negativo (sem adição de DNA). **44**
- Figura-4.** Gel em agarose 1,5%. Amplificação do fragmento do gene CAP59 de diferentes espécies fúngicas utilizando os iniciadores CAP59F e CAP59R . 1- Vetor PUC18 clivado com endonuclease *HaeIII*[®]; 2- *Cryptococcus neoformans* cepa padrão sorotipo A (LMM 794); 3- *Candida krusei*; 4- *Candida parapsilopsis*; 5- *Paracoccidioides brasiliensis*; 6, *Histoplasma capsulatum*; 7- controle negativo (sem adição de DNA). **45**
- Figura-5.** Gel em agarose 1,5% mostrando a sensibilidade dos iniciadores CAP59R e CAP59F na amplificação do fragmento do gene CAP59 frente a diferentes concentrações de DNA de *Cryptococcus neoformans*. 1- Vetor PUC18 clivado com endonuclease *HaeIII*[®] e fago lambda clivado com endonuclease *HindIII*[®], 2- 24ng; 3- 2,4ng; 4- 0,24ng; 5- 24pg; 6- 2,4pg; 7- 0,24pg; 8- 24fg; 9- 2,4fg; 10- 0,24fg; 11- controle negativo (sem adição de DNA). **46**
- Figura-6.** Gel em agarose 1,5% corado pelo brometo de etídeo representativo mostrando o produto amplificado do fragmento do gene CAP59 de isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* direto de cultura utilizando os iniciadores CAP59F e CAP59R . 1- Vetor PUC18 clivado com endonuclease *HaeIII*[®]; 2- controle positivo DNA da cepa LMM794; 3- am.256; 4- am.258; 5- am.77; 6- am.45; 7- am.48; 8- am.60; 9- am.169; 10- am.258; 11- controle negativo (sem adição de leveduras). **46**
- Figura-7.** Gel em agarose 1,5% mostrando a sensibilidade dos iniciadores na amplificação do fragmento do gene CAP59 de *Cryptococcus neoformans* cepa padrão LMM 794 (sorotipo A) de amostra direto de cultura. 1 Vetor PUC18 clivado com endonuclease *HaeIII*[®]; 2- controle **47**

positivo; 3- D.O₆₀₀ =17,0; 4- D.O₆₀₀ =8,5; 5- D.O₆₀₀ =4,26; 6- D.O₆₀₀ =2,13; 7- D.O₆₀₀ =1,06; 8- D.O₆₀₀ =0,53; 9- D.O₆₀₀ =0,26; 10- D.O₆₀₀ =0,13; 11- D.O₆₀₀ = 0,07; 12- D.O₆₀₀ =0,03; 13- D.O₆₀₀ =0,016; 14- controle negativo (sem adição de leveduras).

Figura-8. Gel em poliacrilamida 8% corado pelo brometo de etídeo representativo da digestão dupla pelas endonucleases A e B do fragmento de 597 pb do gene CAP59 do *Cryptococcus neoformans*. 1- Vetor PUC18 clivado com endonuclease *HaeIII*[®]; 2- amostra padrão sorotipo A (LMM794); 3- HC1 e 4- A6 (sorotipos A); 5- padrão sorotipo B (LMM799); 6- AL10 (sorotipo B), 7- padrão sorotipo C (LMM801); 8- padrão sorotipo D (LMM797); 9- A42 (sorotipo D); 10- padrão sorotipo AD (LMM796); 11- AD 48184 (sorotipo AD) e 12- Produto de PCR 597pb não digerido. 49

Figura-9. Gel em agarose 1,5% corado com brometo de etídeo representativo da digestão dupla pelas endonucleases A e B do fragmento de 597 pb do gene CAP59 do *Cryptococcus neoformans*. 1- Vetor PUC18 clivado com endonuclease *HaeIII*[®]; 2- amostra padrão sorotipo A(LMM794); 3- padrão sorotipo B(LMM799); 4- padrão sorotipo C (LMM801); 5- padrão sorotipo D (LMM797); 6- padrão sorotipo AD (LMM796); 7- am.26; 8- am.39; 9- am.41; 10- am.45; 11- am.60; 12- am. 70; 13- am.77 e 14- Produto de PCR 597pb não digerido. 50

Figura-10. Gel poliacrilamida 5% corado pelo brometo de etídeo representativo do perfil de PCR-*fingerprinting* obtido com iniciador M13 das amostras padrões do Rio de Janeiro e amostras de Porto Alegre de *Cryptococcus neoformans*. 1- Marcador de peso molecular 100pb *ladder* (Invitrogen[®]) 2- padrão sorotipo A (LMM794); 3- HC1 (VNI); 4- padrão sorotipo B (LMM799), 5- AL10 (VGIII); 6- padrão sorotipo C (LMM801), 7- padrão sorotipo D (LMM797), 8- A42 (VNIV); 9- padrão sorotipo AD (LMM796); 10- 48184-AD (VNIII); 11- controle negativo (sem adição de DNA). 51

Figura-11. Gel poliacrilamida 5% corado pelo brometo de etídeo representativo do perfil de PCR-*fingerprinting* obtido com iniciador M13 de amostras clínicas de *Cryptococcus neoformans*. 1- Marcador de peso molecular 100pb *ladder* (Invitrogen[®]); 2- padrão sorotipo A (LMM794), VNI; 3- am.26; 4- am.39; 5- am. 41; 6- am. 45; 7- am.77; 8- padrão sorotipo AD (LMM796),VNIII; 9- padrão sorotipo B (LMM799), VGI; 10- padrão sorotipo C (LMM801), VGIV; 11- padrão sorotipo D (LMM797) (VNIV); 12- controle negativo (sem adição de DNA). 51

Figura –12. Gel em agarose 1,5% representativo da reação de RAPD com o iniciador 3303 obtido de amostras clínicas de *Cryptococcus neoformans*. Linha:1 Vetor fago lambda clivado com endonuclease *HindIII*[®]; 2, padrão sorotipo A (LMM794); 3, padrão sorotipo B (LMM799); 4, padrão sorotipo C (LMM801); 5, padrão sorotipo D (LMM797); 6, padrão sorotipo AD (LMM796); 7- am.26; 8- am. 39; 9- am.41; 10- am. 45; 11- am. 48; 12- am. 60; 13- am.70; 14- am.71; 15- am. 76; 16- am.137; 17 am. 77; 18- am. 52

236; 19- controle negativo (sem adição de DNA).

Figura-13. Gel de poliacrilamida 5% representativo da reação de RAPD com o iniciador 3304 obtido de amostras clínicas de *Cryptococcus neoformans* Linha:1- 100pb ladder (Invitrogen®); 2- padrão sorotipo A (LMM794); 3- am. 26; 4- am.39; 5- am.41; 6- am.45; 7- am. 77; 8- padrão sorotipo AD (LMM796),HU17990; 9- padrão sorotipo B (LMM799); 10- padrão sorotipo C (LMM801); 11- padrão sorotipo D (LMM797); 12- controle negativo (sem adição de DNA). **53**

Figura-14. Árvore filogenética geradas através da análise de seqüências de nucleotídeo do fragmento do gene CAP59, pelo método *neighbour-joining* e distância *p* (bootstrap 1000) do fragmento do gene CAP59 das cepas de *C. neoformans* isolados de diferentes amostras clínicas. Programa MEGA v. 1.02® **55**

Figura-15. Árvore filogenética geradas através da análise de seqüências preditas de aminoácidos do fragmento do gene CAP59 pelo método *neighbour-joining* e distância *p* (bootstrap 1000) das seqüências de aminoácidos preditas do fragmento do gene CAP59 das cepas de *C. neoformans* isolados de diferentes amostras clínicas. Programa MEGA v. 1.02.® **55**

LISTA DE TABELAS

Tabela1. Variedades e sorotipos da espécie <i>Cryptococcus neoformans</i>	06
Tabela2. Principais Fatores de virulência e sobrevivência do <i>Cryptococcus neoformans</i> no hospedeiro e no ambiente.	10
Tabela 3 - Representação dos protocolos utilizados para a Extração de DNA genômico.	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP	Amplificação de fragmentos aleatórios do DNA (do inglês <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>)
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
am.	Amostra
CDC	Center of Disease Control
CG	Circle Grow medium-USB [®]
CGB	Canavanina-glicina-bromotimol
CNRE-1- 1	Elementos Repetitivos de <i>Cryptococcus neoformans</i> -1
D.O.	Densidade óptica
DAQ-	orto-dopacrome
DHN	1,8 – dihidrixinaftaleno
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DOPA- a	Diidroxifenilalanina a
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Imunoensaio Enzimático (do inglês <i>Enzyme Linked Immunossorbent Assay</i>)
<i>g</i>	Força da gravidade
GHB	glutaminil – 4- hidroxibenzeno
GXM	Glicoronoxilomanana
HAART	Terapia Antiretroviral (do inglês <i>Highly Active Antiretroviral Treatment</i>)
HIV	Vírus da Imunodeficiência humana
HNR	Hospital Nereu Ramos

ITS	Seqüência espaçadora interna transcrita (do inglês <i>Internal Transcribed Sequence</i>)
Kb	Quilobases
LCR	Líquido cefaloraquidiano
M	Molaridade
Mb	Megabases
mM	Milimolar
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia de polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RAPD	Amplificação aleatória do DNA (do ingles <i>Random amplified polymorphic DNA</i>)
RFLP	Fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição (do inglês <i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>)
RNA	Ácido Ribonucléico
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SNC	Sistema nervoso central
U	Unidade de Atividade
UV	Ultra violeta
v/v	Volume por Volume
Tris	Tris (hidroximetil) amino metano
var.	Variedade

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
1.0 INTRODUÇÃO	01
1.1 O Organismo e o ciclo biológico	01
1.2 Histórico	05
1.3 Patogenia	07
1.4 Fatores de virulência	10
1.5 Diagnóstico	13
1.6 Tratamento e resistência	18
1.7 Epidemiologia	20
2.0 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos	24
3.0 METODOLOGIA	25
3.1 Considerações Éticas	25
3.2 Pacientes	25
3.3 Origem das amostras	26
3.4 Extração de DNA genômico	27
3.4.1 Protocolo – 1	27
3.4.2 Protocolo – 2	28

3.4.3 Protocolo – 3	28
3.4.4 Protocolo – 4	29
3.4.5 Protocolo – 5	29
3.4.6 Protocolo – 6	30
3.4.7 Protocolo - 7	30
3.4.8 Protocolo - 8	31
3.4.9 Protocolo – 9	31
3.4.10 Protocolo – 10	32
3.4.11 Protocolo – 11	32
3.4.12 Protocolo – 12	33
3.4.13 Eluição, visualização e armazenamento das amostras	35
3.5 Amplificação do fragmento do gene CAP59	35
3.6 Determinação da especificidade da reação de amplificação do fragmento do gene CAP59 a partir de DNA genômico	36
3.7 Determinação da sensibilidade da reação de amplificação do fragmento do gene CAP59 a partir de DNA genômico	36
3.8 Preparação das amostras de cultura para a reação de amplificação do fragmento do CAP59 em amostras de cultura	37
3.9 Determinação da sensibilidade da reação de amplificação do fragmento do gene CAP59 a partir de amostras direto de cultura	37
3.10 Preparação das amostras direto do líquido para a reação de amplificação do fragmento do CAP59	38
3.11 Avaliação da interferência da anfotericina B na amplificação do fragmento do CAP59 em amostras de cultura	38
3.12 Identificação dos sorotipos das amostras padrões e das amostras clínicas de <i>Cryptococcus neoformans</i> através da reação de PCR-RFLP	39
3.13 PCR <i>fingerprinting</i>.	39
3.14 Amplificação de DNA das amostras através da técnica de RAPD	40

3.15 Eletroforese de produtos de amplificação	40
3.16 Purificação do produto amplificado do fragmento do gene CAP59	41
3.17 Sequenciamento do fragmento do gene CAP59	41
3.18 Análise das seqüências obtidas	42
4.0 RESULTADOS	43
4.1 Dados Epidemiológicos	43
4.2 Extração de DNA	43
4.3 Padronização da reação de amplificação do gene CAP59 a partir de DNA genômico das amostras clínicas	44
4.4. Determinação da especificidade da reação de amplificação do fragmento do gene CAP59 a partir de DNA genômico	45
4.5. Determinação da sensibilidade da reação de amplificação do fragmento do CAP59 a partir de DNA genômico	45
4.6 Padronização da reação de amplificação do fragmento do gene CAP59 diretamente de amostras de cultura de isolados clínicos	46
4.7. Determinação da sensibilidade dos iniciadores na amplificação do fragmento do gene CAP59 em amostras de <i>Cryptococcus neoformans</i> direto de cultura	47
4.8 Amplificação do gene CAP59 diretamente de amostras clínicas de líquido	47
4.9 Avaliação da interferência da anfotericina B na amplificação do fragmento do CAP59 em amostras de cultura	48
4.10 Determinação dos sorotipos de cepas de <i>C. neoformans</i> isoladas de amostras clínicas e ambientais no Estado do Rio Grande do Sul através da PCR-RFLP	48
4.11 Determinação do perfil de restrição das amostras clínicas isoladas no Estado de Santa Catarina através da PCR-RFLP	49
4.12 Determinação dos padrões moleculares através da técnica de PCR <i>fingerprinting</i>.	50
4.13 Avaliação da variabilidade genética de <i>Cryptococcus neoformans</i> através da técnica de RAPD	52
4.14 Sequenciamento e análise do fragmento do gene CAP59	53

5.0 DISCUSSÃO	56
6.0 CONCLUSÕES	68
7.0 PERSPECTIVAS	69
8.0 REFERÊNCIAS	70

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 O organismo e o seu ciclo biológico

Os organismos agrupados no Reino Fungi são, em geral, bem adaptados a uma ampla variedade de condições ambientais e, usualmente, com poucas exigências nutricionais. Das mais de 100.000 espécies de fungos existentes, apenas aproximadamente 0,1% causam infecções em humanos (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992, RICHARDSON; WARNOCK, 1993; SIDRIN; MOREIRA, 1999).

Dentre os fungos causadores de infecções em humanos, *Cryptococcus neoformans* é uma levedura capsulada pertencente ao Filo Basidiomycota, Ordem Sporidiales e Família Sporidiobalaceae (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). *C. neoformans* apresenta-se na forma leveduriforme quando em estágio parasitário ou ambiental (*Cryptococcus*), e na forma filamentosa em determinadas condições ambientais (*Filobasidiella*) (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; REY et al., 2000). A capacidade desta levedura de infectar humanos e animais está relacionada a diversos fatores, dentre os quais pode-se destacar a facultativa patogenicidade intracelular (FELDMESSER et al., 2000), a presença de uma cápsula polissacarídica com atividade antifagocítica (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; CHANG; PENOYER; KWON-CHUNG, 1996), a produção de melanina como antioxidante (WANG et al., 1995; TUCKER; CASADEVALL, 2002), a produção de urease (COX et al., 2000), a habilidade de crescer a 37°C (CASADEVALL; PERFECT, 1998) e a presença de genes sexuais específicos com locus *mating type* (MAT α e MATa) (KWON-CHUNG; EDMAN; WICKES, 1992).

O gênero *Cryptococcus* compreende 19 espécies entre as quais está o *C. neoformans* que agrupa três variedades que causam a grande maioria dos quadros de criptococose humana

(CASADEVALL; PERFECT, 1998). Embora raros, existem relatos de outras espécies do gênero infectando humanos como o *Cryptococcus laurenti* (CURTIS; HALLER; DE JUAN, 1995), *C. curvatus* (DROMER et al., 1995), *C. albidus* (GLUCK; MYERS; PASS, 1987), *C. diffuens* e *C. liquefaciens* (SUGITA et al., 2003).

O ciclo reprodutivo de *C. neoformans* pode ocorrer de forma sexuada ou assexuada. A reprodução sexuada ainda não foi observada no meio-ambiente, mas tem sido bem demonstrada em condições de laboratório. As formas teleomórficas ou sexuais são designadas *Filobasidiella neoformans* (KWON-CHUNG 1975, 1976a, 1976b) e se caracterizam por conter hifas dicarióticas, ou seja, hifas que contém dois núcleos de origens diferentes, e também possuem a capacidade de formar fíbulas que são estruturas responsáveis pela manutenção do estado dicariótico e de longas cadeias de basidiosporos. Para que a reprodução sexuada ocorra é necessária uma compatibilidade bipolar, ou seja, a existência de alelos opostos nos loci sexuais (*mating*), MAT α e MATa (KWON-CHUNG; HILL; BENNETT, 1981; ALSPAUGH; DAVIDSON; HEITMAN, 2000; LENGELER et al., 2000; MARRA et al., 2004). Estes “tipos sexuais” (do inglês *mating types*) apresentam um importante papel na epidemiologia e virulência desse fungo (ESPOSTO et al., 2004).

Estudos recentes revelaram várias disparidades entre o ciclo sexual de *C. neoformans* e o de outros fungos (McCLELLAND et al., 2004). Primeiro, as características morfológicas do estado sexual são únicas; segundo, o locus sexual de *C. neoformans* é extenso e possui resposta específica aos feromônios; terceiro, muitos desses genes sexuais específicos desempenham diferentes funções em células MATa e MAT α . O ciclo sexual se dá na ausência de nitrogênio, quando as células MATa secretam o feromônio MFa e as células MAT α respondem produzindo o feromônio MF α , iniciando assim, a formação dos tubos de conjugação. As células MAT α sofrem divisão de seu núcleo, e um desses migra pelo tubo. Simultaneamente, a célula MATa também sofre divisão nuclear e inicia a formação da hifa.

Núcleos de ambos os sexos migram para o interior da hifa. A hifa capta a mitocôndria produzida pela célula MAT α , já a mitocôndria das células MAT α é destruída. Em seguida a hifa é separada da célula MAT α e ocorre o desenvolvimento dos filamentos dicarióticos com a participação das fíbulas (McCLELLAND et al., 2004) (Figura 1).

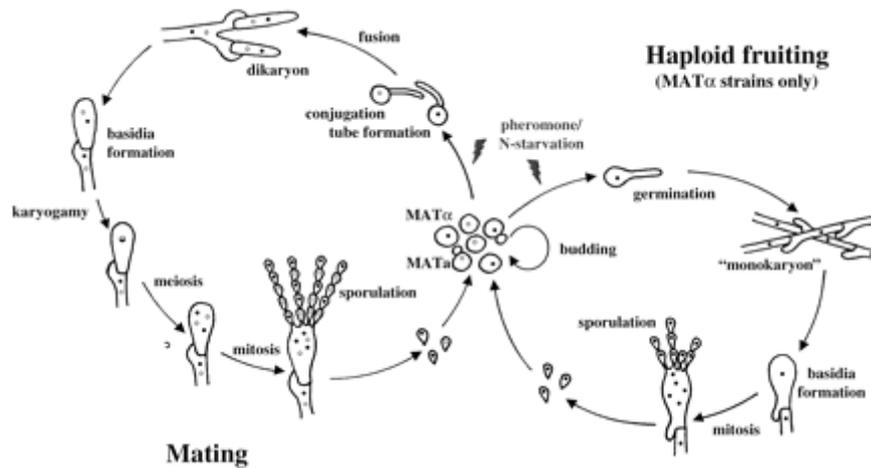


Figura-1. Representação esquemática do ciclo vital de *Cryptococcus neoformans*. À direita, reprodução sexuada e, à esquerda, reprodução assexuada. Adaptado de Lengeler et al. (2000).

As basídias desenvolvem-se a partir da fusão nuclear na célula, processo esse denominado de cariogamia. Subseqüentes meioses e mitoses ocorrem e quatro cadeias longas de basidiosporos são produzidas, podendo diferenciar-se e gerar células leveduriformes de tamanho aproximado de 1,8 μ m a 3 μ m de diâmetro (ERKE, 1976 apud LENGELER et al., 2000).

As formas anafórmicas ou assexuadas são encontradas normalmente na natureza. O ciclo assexuado dessa levedura ocorre tanto em células MAT α como nas células MAT α , no entanto, na natureza a maior prevalência ocorre em células MAT α através da formação de corpos haplóides de frutificação em resposta à ausência de nitrogênio e na ausência de células MAT α (TSCHARKE et al., 2003). Esse processo caracteriza-se por gerar quantidades abundantes de blastoconídios através da filamentação oriunda de um único núcleo (filamentos monocarióticos) (ERKE, 1976 apud; LENGELER et al., 2000). A predominância das células

MAT α no meio ambiente e nos isolados clínicos, bem como seu maior grau de virulência quando comparadas com as células MAT α , sugerem que as diferenças fisiológicas e genéticas entre os dois tipos sexuais levam à sobrevivência de células MAT α (KNOW CHUNG; EDMAN; WICKES, 1992; LENGELER et al., 2000; McCLELLAND et al., 2004; BARCHIESI et al., 2005). Além disso, segundo Barchiesi et al. (2005), a presença de alelo sexual A α em cepas haplóides ou diplóides está correlacionada com virulência, enquanto que cepas com alelos A α ou Da haplóides estão associadas com virulência moderada ou ausente. Recentemente, Lin Hull e Heitman (2005), avaliaram a capacidade de *C. neoformans* do tipo sexual alfa (MAT α) de reproduzir-se através da denominada frutificação monocariótica sexual. Esse estudo suporta a origem de basidiósporos através da união entre células com mesmos tipos sexuais (MAT α). Essa reprodução também inclui a fusão celular, filamentação, formação de basídios, meiose e esporulação, como ocorre na reprodução sexual de células com tipos sexuais diferentes (MAT α e MAT α). O que distingue essa frutificação sexual é o fato da fusão nuclear ocorrer ao mesmo tempo em que a fusão celular. Esse estudo sugere que a endoduplicação (reprodução entre células do mesmo tipo sexual) pode conferir vantagens quando o tipo sexual oposto for raro, resultando assim, numa mudança de ciclo de vida de um heterotático para um homotático, provendo, dessa forma, um mecanismo para sobrevivência do MAT α . Além disso, a frutificação monocariótica sexual com “auto-diploização” pode promover “meioses benéficas”, remoção de *transposons* e, além disso, poderá levar a rearranjos e reparos de locais no genoma que sofreram mutagênese devido à pressão ambiental (LIN; HULL; HEITMAN, 2005).

1.2 Histórico

A primeira descrição clínico-patológica e micológica da criptococose humana foi atribuída a Otto Busse e Abrham Buschke, em 1894, que descreveram o caso de uma mulher de 31 anos com uma lesão na tíbia (KNOKE; SCHWESINGER, 1994). O microrganismo isolado dessa lesão foi cultivado para estudos comparativos com isolados subseqüentes e denominado *Saccharomyces hominis*. No mesmo ano, na Itália, Sanfelice (SANFELICE, 1894 apud CASADEVALL; PERFECT, 1998) isolou leveduras capsuladas a partir de suco de pêssego fermentado e, no ano seguinte, demonstrou sua patogenicidade em animais de laboratório e denominou a espécie *Saccharomyces neoformans* (CASADEVALL; PERFECT, 1998). Posteriormente, Vuillemin, em 1901, analisando essas amostras não verificou a presença de ascósporos característicos do gênero *Saccharomyces*, sugerindo tratar-se de um novo gênero, denominando-o de *Cryptococcus* e a espécie de *C. neoformans* (SIDRIM; MOREIRA, 1999). No Brasil, os primeiros dois casos humanos relatados foram em 1941 e 1944 por Lacaz e Almeida, respectivamente (REIS-FILHO et al., 1985; PAPPALARDO; MELHEM, 2004).

No final do século XIX, foram realizados os primeiros isolamentos de *C. neoformans* a partir de solo, madeira em decomposição, habitat de aves, particularmente excrementos de pombos, fundamentando o conceito de origem ambiental da infecção. Da mesma forma, a recuperação do microorganismo a partir de lesões humanas e de animais estabeleceu seu potencial patogênico (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

Os estudos taxonômicos de *C. neoformans* progrediram consideravelmente na década de 70. A observação por Shadomy (1970) da presença de fibulas em um isolado de *C. neoformans*, sugeriu que esse fungo era um basidiomiceto, pois essas estruturas mantêm a condição dicariótica durante o desenvolvimento, na maioria das espécies e são altamente características deste filo (SHADOMY et al., 1970 apud CASADEVALL; PERFECT, 1998;).

Kwon-Chung (1975, 1976a, 1976b) descreveu dois tipos sexuais (MAT α e MATa) para *C. neoformans* que, sob certas condições, produziram basidiosporos férteis.

C. neoformans foi, subseqüentemente, dividido em cinco sorotipos (A, B, C, D e AD), através da sorotipagem baseada na reação imunológica com anti-soro produzido contra diferentes epítomos do polissacarídeo que compõe a cápsula dessa levedura (IKEDA et al., 1982; NISHIKAWA et al., 2003; D'SOUZA et al., 2004). Análises fenotípicas, epidemiológicas, ecológicas, fisiológicas e genéticas dividiram a espécie em três variedades: *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A), *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) e *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C). O sorotipo AD foi classificado como um híbrido diplóide dos sorotipos A e D (Tabela 1). Análises filogenéticas sugerem que a variedade *gattii* (sorotipos B e C) diverge das outras duas variedades em cerca de 37 milhões de anos, e que a variedade *grubii* (sorotipo A) e variedade *neoformans* (sorotipo D) divergem entre si em aproximadamente 19 milhões de anos (XU; VILGALYS; MITCHELL, 2000; MARRA et al., 2004).

Tabela 1. Variedades e sorotipos da espécie *Cryptococcus neoformans*

Variedades	Sorotipos	Referências
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	A	FRANZOT et al., (1999).
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	D	KWON-CHUNG; POLACHECK; BENNETT, (1982b), ELLIS ;PTEIFFER, (1990).
<i>C. neoformans</i> var. <i>gattii</i>	B e C	KWON-CHUNG; POLACHECK; BENNETT, (1982b), ELLIS; PTEIFFER, (1990).
Híbrido diplóide dos sorotipos A e D	AD	KWON-CHUNG; BENNET, (1984), LENGELER et al., (2000), XU ; MITCHEL,

1.3 Patogenia

A infecção humana por *C. neoformans* está relacionada com a disfunção da imunidade inata do hospedeiro (KAWAKAMI, 2004). Esta ocorre provavelmente através da inalação de pequenas partículas de origem sexual, basidiósporos (3µm) ou com as de origem assexual, blastoconídios pouco capsulados (4 a 5µm) presentes no ambiente, podendo, inicialmente, causar infecção sintomática ou assintomática na área subpleural dos pulmões, ser erradicada ou, ainda, permanecer dentro de um granuloma em estado latente (CASADEVALL; PERFECT, 1998; MITCHELL; PERFECT, 1995; LACAZ et al., 2002; KAWAKAMI, 2004). Entretanto, dependendo de fatores do hospedeiro, da quantidade do inóculo e da virulência do isolado, a levedura pode se disseminar para sítios extrapulmonares do hospedeiro (BICANIC; HARRISON, 2005).

Em pacientes imunocompetentes, por exemplo, a infecção é usualmente limitada, ou seja, os mecanismos de defesa do hospedeiro podem eliminar ou limitar a infecção a um quadro de pneumonia severa (BOLAÑOS; MITCHEL, 1989; BICANIC; HARRISON, 2005). Contrariamente, em pacientes imunocomprometidos a infecção não é limitada ao primeiro sítio, podendo se disseminar através da corrente sanguínea para outros órgãos e tecidos, preferencialmente para o sistema nervoso central (SNC), onde está associada a quadros de meningite, meningoencefalite ou encefalite com altas taxas de letalidade (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; ELLIS et al., 2000; KAWAKAMI, 2004).

O aumento na ocorrência de infecções fúngicas graves, a partir da década de 80, pode ser atribuído a vários fatores, como o aparecimento da AIDS e o crescente uso de agentes imunossupressores em transplantes e no tratamento quimioterápico de neoplasias (ELLIS et

al., 2000). A importância clínica de *C. neoformans* aumentou consideravelmente como consequência da elevada incidência da AIDS a partir de 1981 (MITCHELL; PERFECT, 1995; CASADEVALL; PERFECT, 1998). Cerca de 5 a 10% dos pacientes portadores de HIV desenvolvem criptococose, representando a maioria dos casos relatados na literatura desde 1981 (CDC, 2003). Nos Estados Unidos, 85% dos casos de criptococose ocorrem em pacientes infectados pelo HIV (CDC, 2003). Atualmente, o diagnóstico de uma infecção por *C. neoformans* sugere uma avaliação clínico-laboratorial para verificar uma possível co-infecção pelo HIV.

Antes da introdução HAART, aproximadamente 5 a 8% dos pacientes infectados pelo HIV desenvolviam criptococose disseminada (MONARI et al., 2002). Entretanto, após o uso efetivo das HAARTs, a incidência e a letalidade no quadro da criptococose associada ao vírus HIV diminuíram substancialmente para índices de 2 a 7 casos por 1.000 pacientes com AIDS (CDC, 2005; MANFREDI; CALZA; CHIODO, 2003). No entanto, em algumas partes do mundo, particularmente na África e na Ásia, a incidência permanece elevada, e taxas crescentes são esperadas nessas regiões (KWON-CHUNG et al., 2000; BROUWER et al., 2004; BICANIC; HARRISON, 2005).

Via de regra, a infecção pelo *C. neoformans* é adquirida por inalação de propágulos fúngicos, embora existam relatos de inoculação direta do fungo através de injúria na pele (HAMANN et al., 1997). A transmissão entre seres humanos ou de animais a seres humanos não está totalmente comprovada (SORRELL, 2001). Apesar da relativa raridade da infecção sintomática em indivíduos hígidos, existem evidências sorológicas de que a infecção em humanos é comum, devendo ocorrer no início da infância (GOLDMAN et al., 2001).

As manifestações clínicas da criptococose incluem desde um simples nódulo no pulmão até a disseminação sistêmica do microorganismo. Essa variedade depende do estado imune e da resposta imune do hospedeiro, bem como da virulência da cepa. A criptococose

pulmonar está comumente associada a pacientes imunocompetentes (LALLOO; AMOD, 2005), ao contrário da meningite criptocócica que está diretamente associada a pacientes com AIDS ou com depressão do sistema imune devido ao tratamento com corticóides, falência crônica dos órgãos (rins, fígado e pulmões), transplante de órgãos, doenças reumáticas, outras infecções fúngicas, terapias imunossupressivas e desordens linfoproliferativas (THOMPSON, 2005; BICANIC; HARRISON, 2005). A criptococose cutânea corresponde à terceira forma mais prevalente da enfermidade causada por *C. neoformans*, caracterizando uma forma de disseminação em 10 a 15% dos pacientes com criptococose, sendo os locais mais atingidos a cabeça e o pescoço (LALLOO; AMOD, 2005; REY et al., 1999; KUMAR et al., 2005). Outros locais atingidos pela disseminação sistêmica da criptococose incluem retina, conjuntiva, seios paranasais, esôfago, próstata, glândulas adrenais, ossos, coração, fígado, linfonodos, articulações, músculos, rins e placenta (CASADEVALL; PERFECT, 1998; MITCHELL; PERFECT, 1995). Na população mundial, a maioria das infecções causada em hospedeiros imunocomprometidos é ocasionada por *C. neoformans* var. *grubii* (MITCHELL; PERFECT, 1995; CASADEVALL; PERFECT, 1998), enquanto que as infecções em hospedeiros imunocompetentes são ocasionadas por *C. neoformans* var. *gattii* (SORRELL, 2001, BICANIC; HARRISON, 2005). Em condições naturais, as variedades de *C. neoformans* residem em nichos ambientais diferentes. A variedade *grubii* e *neoformans* tem sido isolada no solo e em habitats de aves, principalmente nas fezes de pombos (LEVITZ, 1991). Já a variedade *gattii* está associada a flores das árvores de *Eucalyptus* spp. (ELLIS; PFEIFFER, 1990), bem como outras espécies de árvores (LAZERA et al., 1998; PAPPALARDO; MELHEM, 2004).

1.4 Fatores de virulência

C. neoformans possui fatores de sobrevivência no ambiente, assim como fatores de virulência bem definidos, sendo conhecidos por desempenhar funções importantes na patogenicidade dessa levedura. Um resumo destes fatores é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Principais fatores de virulência e de sobrevivência de *Cryptococcus neoformans* no hospedeiro e no meio-ambiente.

Atributos	Funções no Ambiente	Funções na Patogênese	Referências
Cápsula	Prevenção da dissecação Proteção contra predação por amebas	Antifagocitose Imunomodulador Agressão intracelular	FELDMESSER, et al (2000); AKSENOV, (1973); KOZEL, et al. (1988); STEENBERGEN, et al., (2001); VECCHIARELLI, (2000).
Lacase	Degradação de lignina	Interferência na ação antioxidante	LAZERA, et al., 1996; LIU; TEWARI; WILLIAMSON, (1999).
Melanina	Proteção contra raios ultravioleta; tolerância ao aumento e diminuição da temperatura; redução da suscetibilidade a degradação enzimática; proteção contra metais pesados; proteção contra predação por amebídeos	Resistência à morte oxidativa Antifagocitose Imunomodulador Resistência a peptídeos microbicidas Resistência a drogas antifúngicas	STEENBERGEN, et al., (2001); WANG; CASADEVALL, (1994), (1995); ROSAS; CASADEVALL, (1997); GARCIA-RIVERA; CASADEVALL,(2001); DOERING, et al., (1999); WANG et al.,(2001); HUFFNAGLE, (1995); VAN DUIN, (2002).
Fosfolipase	Função nutricional Proteção contra predação por amebóides	Crescimento intracelular	STEENBERGEN, et al., (2001); GHANNOUM, 2000; COX, et al., (2001).
Proteases	Função nutricional	Lesão de tecidos	FELDMESSER, et al ., (2000), ; AKSENOV, (1973); KOZEL, et al.,(1988);, STEENBERGEN, et al

			(2001); VECCHIARELLI, (2000).
Uréase	Captura de nitrogênio	Crescimento intracelular	COX, et al., (2000).
Mudanças fenotípicas	Adaptação de cepas ao estresse ambiental	Invasão imune	FRIES et al., (2001); GOLDMAN, (1998).
Mating types	Reprodução sexual	Fator regulador da virulência	WICKES, (2002).
Cálcio e sinalização de cAMP	Desenvolvimento reprodução	e Fator regulador da virulência	CRUZ; FOX; HEITMAN, (2001); D'SOUZA; HEITAMN, (2001).
Superóxido dismutase	Função antioxidante	Crescimento intracelular	COX, et al., (2003).

Fonte: Adaptada de CASADEVALL; STEENBERGEN; NOSANCHUK, (2003).

De maneira geral, *C. neoformans* produz um pigmento escuro (melanina) quando cultivado em meios contendo compostos difenólicos (POLACHECK et al., 1982; CHANG et al., 2000). As melaninas encontradas em fungos são derivadas de quatro precursores: dihidroxifenilalanina (DOPA); glutaminil – 4- hidroxibenzeno (GHB); catecol e 1,8 – dihidrixinaftaleno (DHN), os quais formam respectivamente, a DOPA-melanina, a GHB-melanina, a Catecol-melanina e a DHN- melanina (BUTLER; DAY, 1998). A melanina de *C. neoformans* é a representante clássica da categoria das DOPA-melaninas, que tem como precursor intermediário orto-dopacrome (DAQ) (ZHU; WILLIAMSON, 2004). Esse fungo capta precursores dopaminérgicos do ambiente extracelular e, através da enzima lacase (fenoloxidase) associada à membrana celular, sintetiza melanina (ZHU et al., 2001). Dessa forma, pode-se associar a capacidade de produção de melanina desse fungo com o tropismo desse patógeno pelo SNC (NOSANCHUK; CASADEVALL, 1997).

Um dos fatores a ser considerado é a produção da cápsula polissacarídica por *C. neoformans*. Essa capacidade pode ser facilmente observada sob de microscópio óptico, em condições experimentais rotineiras. Ferramentas imunoquímicas, como as variedades de anticorpos monoclonais que possuem reatividade à cápsula são provas da composição capsular (GATES; THORKILDSON; KOZEL, 2004). A cápsula foi o primeiro fator de virulência de *C. neoformans* a ser associado à patogênese e é considerada como um dos principais determinantes desta (MA; MODY, 2002).

O principal constituinte da cápsula de *C. neoformans* é a glicoronoxilomanana (GXM), que possui tamanho molecular estimado entre $1,2 - 1,5 \times 10^6$ daltons (GATES; THORKILDSON; KOZEL, 2004), sendo composta de [1-4] D-manopiranos contendo cadeias simples de xilose [posição 2-0 e 4-0] e resíduos de ácido glicurônico [posição 2-0]. Seis diferentes estruturas de GXM são descritas com base no conteúdo de resíduos de xilose, além de outras diferenças bioquímicas (CHERNIAK; NEILL; SHENG, 1998). O tipo e a prevalência do grupo GXM reportado na espécie de *C. neoformans* usualmente estão correlacionados com diferenças na reatividade sorológica que tem sido utilizada para classificar cepas em cinco sorotipos (A, B, C, D e AD) (IKEDA et al., 1982; (CHERNIAK; NEILL; SHENG, 1998).

No meio-ambiente, a cápsula polissacarídica é um mecanismo de proteção contra a desidratação, possibilitando a sobrevivência em condições de baixa umidade (CASADEVALL; STEENBERGEN; NOSANCHUK, 2003), sendo importante na defesa contra fagocitose por amebas no solo (STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001). A produção da cápsula é bastante afetada pelas condições ambientais (ZARAGOZA; CASADEVALL, 2004). Durante a cultura *in vitro*, o tamanho da cápsula é pequeno e o alargamento capsular pode ser induzido por vários fatores, incluindo altas concentrações de CO₂ e baixas concentrações de ferro (GRANGER; PERFECT; DURACK, 1985; VARTIVARIAN et al., 1993). Com base nessas observações, o aumento da cápsula na infecção no hospedeiro mamífero pode estar relacionado às altas concentrações de CO₂ (pulmão) e à baixa concentração de ferro nos tecidos (CASADEVALL; PERFECT, 1998; ZARAGOZA; CASADEVALL, 2004). O aumento capsular é visível dentro de algumas horas após a infecção, e a virulência pode ser realçada através das propriedades capsulares (D'SOUZA et al., 2004). O interessante é que após vários dias de infecção, o aumento da cápsula é acompanhado por um aumento no volume celular, tendo como resultado formas

gigantes de leveduras (FELDMESSER et al., 2001). Segundo o estudo de Zaragoza e Casadevall (2004) o aumento capsular é inversamente proporcional à taxa de multiplicação das leveduras, ou seja, nos pulmões a cápsula das leveduras apresenta-se mais espessa e a multiplicação é menor, enquanto que no cérebro, a taxa de multiplicação das leveduras é maior e a espessura capsular é menor (RIVERA et al., 1998), refletindo assim, a importância do ambiente no tamanho da cápsula e na multiplicação da levedura (ZARAGOZA; CASADEVALL, 2004). A proteção que a cápsula polissacarídica oferece ao *C. neoformans*, contra a fagocitose mediada por macrófagos, neutrófilos e monócitos pode interferir na resposta imune após sua difusão nos tecidos. A diminuição da fagocitose compromete a apresentação de antígenos a células T resultando, conseqüentemente, em resposta imune deficitária (BUCHANAN; MURPHY, 1998; GATES; THORKILDSON; KOZEL, 2004). A fixação do complemento e a produção de citocinas são também afetadas pela cápsula (VERCCHIARELLI et al., 1996; BUCHANAN; MURPHY, 1998). Estudos revelaram que a deleção de alguns dos genes relacionados à cápsula, como o CAP10 (CHANG; KWON-CHUNG, 1999), o CAP59 (CHANG; KWON-CHUNG, 1994), o CAP60 (CHANG; KWON-CHUNG, 1998) e o CAP64 (CHANG; PENOYER; KWON-CHUNG, 1996) resultaram em mutantes sem cápsulas e avirulentos e que a reintrodução de uma cópia funcional do gene no respectivo mutante restaurou a produção de cápsula e a virulência, demonstrando que estes genes são essenciais na formação da cápsula. No entanto, suas funções bioquímicas na via de síntese da cápsula permanecem desconhecidas (CHANG; KWON-CHUNG, 1994; CHANG, PENOYER, KWON-CHUNG, 1996; CHANG; KWON-CHUNG, 1998). Gates, Thorkildson e Kozel (2004) demonstraram que mutantes acapsulados são avirulentos e facilmente ingeridos por neutrófilos ou macrófagos.

1.5 Diagnóstico

O diagnóstico da criptococose, pela demonstração do agente etiológico, raramente é um problema em pacientes com AIDS. No entanto, em pacientes aparentemente imunocompetentes, pode-se apresentar negativo ocasionando resultado falso negativo (BICANIC; HARRISON, 2005). As leveduras de *C. neoformans* podem ser visualizadas facilmente em espécimes clínicos como líquido cefaloraquidiano (LCR), escarro e lavado brônquico e outros tipos de secreções ou fluidos por microscopia óptica em suspensões aquosas contendo tinta da China. Nesta coloração, as partículas da tinta são excluídas pela cápsula, que aparece como uma zona clara ao redor da célula da levedura (ZERPA; HUICHO; GUILLEN, 1996). As células são usualmente esféricas com 5 a 7 μm de diâmetro. Elas se apresentam tipicamente sem brotamento e/ou com fibulas. O tamanho da cápsula pode variar de tamanho podendo ser menor, igual ou exceder o diâmetro da célula. As células raramente podem apresentar-se fora do seu tamanho médio, mais elípticas que esféricas, com múltiplos brotamentos ou sem cápsula.

Em pacientes com meningite criptococócica, pode ocorrer um aumento no número de leucócitos no LCR, com predominância de linfócitos. Em pacientes com meningite criptococócica associada à infecção pelo HIV, a contagem de leucócitos no LCR é baixa, podendo estar em níveis normais. A dosagem de proteínas no LCR é usualmente elevada e a dosagem de glicose pode ser baixa. O diagnóstico laboratorial através do teste da tinta da China é positivo em 70-90% dos pacientes com AIDS, porém cai para somente 50% em pacientes imunocompetentes (BICANIC; HARRISON, 2005). *C. neoformans* pode ser isolado em meios de cultura que contenham uma fonte de carbono, nitrogênio, oxigênio e oligoelementos (CASADEVALL; PERFECT, 1998), produzindo colônias brancas mucóides (dependendo da espessura da cápsula), usualmente após 48 e 72 horas.

Nenhuma espécie do gênero *Cryptococcus* fermenta açúcares, porém todas têm atividade de urease. A patogenicidade de *C. neoformans* está relacionada com a sua capacidade de crescer a 37 °C. No entanto, a temperatura ótima de crescimento está entre 30-35°C. Em meios de cultura como o ágar níger, a presença de compostos difenólicos propicia a produção de fenol oxidase que leva à formação de melanina, que pode ser observada pelo aparecimento de coloração marrom nas colônias (STAIB, 1962 apud STEPANOVIC, et al., 2002). Muitos laboratórios utilizam o teste rápido de urease para um reconhecimento de *C. neoformans*. A identificação taxonômica dos isolados pode ser feita por provas bioquímicas em testes comerciais ou por métodos baseados em análise do DNA (ELLIS; PFEIFFER, 1990; ST GERMAIN; BEAUCHESNE, 1991; WARREN; SHADOMY, 1991 apud HUFFNAGLE; GANDER, 1993; MITCHELL, et al., 1994). Alguns sorotipos de *C. neoformans* podem ser diferenciados pela reação de coloração quando cultivados em meio ágar azul de canavanina-glicina-bromotimol (CGB) (KWON-CHUNG; POLACHECK; BENNETT, 1982). Os sorotipos também poderiam ser separados através do *kit* comercial Crypto Check® (Iatron, Tokyo, Japan), que utilizava anticorpos monoclonais dirigidos contra antígenos específicos da cápsula polissacarídica (IKEDA et al., 1982; KABASAWA et al., 1991).

Anticorpos séricos contra *C. neoformans* não são utilizados no diagnóstico laboratorial da criptococose. Por outro lado, a detecção de antígenos da cápsula polissacarídica nos fluidos corporais é rápida e simples. Dentre os testes mais comumente empregados estão os testes de aglutinação comerciais em partículas de látex sensibilizadas com anticorpos anti-*C. neoformans* ou a técnica de ELISA. Esses testes têm uma sensibilidade superior a 90% e títulos maiores que 1:4 são bem específicos para criptococose. O LCR, o soro, a urina e os lavados brônquicos podem ser utilizados nessas reações (BLOOMFIELD; GORDON; ELMENDORF, 1963; BICANIC; HARRISON, 2005).

O diagnóstico histopatológico da criptococose é comum a outros tipos de infecção fúngica. As amostras de tecidos são geralmente coradas pelos métodos de Gomori Metamina Prata, ácido periódico de Scchiff. Pelo método de mucicarmina, as estruturas fúngicas coram-se em vermelho e pelo método de Fontana-Manson, os fungos apresentam-se corados em marrom, sendo esta coloração mais específica para *C. neoformans* (BICANIC; HARRISON, 2005).

Inúmeras técnicas baseadas na análise do DNA têm sido utilizadas para estudos de caracterização, filogenia e epidemiologia de *C. neoformans*. Essas técnicas incluem a eletroforese de campo pulsado, que demonstrou polimorfismos de tamanho de cromossomos entre os isolados de *C. neoformans* (DROMER et al., 1994; KWON-CHUNG et al., 1992; PERFECT et al., 1993; PERFECT et al., 1989; POLACHECK; LEBENS, 1989; SPITZER et al., 1993; WICKES; MOORE; KWON-CHUNG, 1994), e análises de RFLP (fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição) seguidas de hibridização com sonda CNRE-1 (elementos repetitivos de *C. neoformans*), que reconhece a família de elementos repetitivos presentes em múltiplas cópias no genoma de *C. neoformans* (SPITZER; SPITZER, 1992; SPITZER; SPITZER, 1994). Franzot et al. (1997) analisando a diversidade genética de isolados *C. neoformans* do Brasil e da cidade de Nova York (EUA), através do perfil de RFLP da seqüência do gene URA5, sugeriram uma dispersão global de certos isolados patogênicos. Outras sondas, como a UT-4p, um plasmídeo linear de 7Kb contendo o gene URA5 (DROMER, et al., 1994; VARMA, KWON-CHUNG et al., 1992; CURRIE; FREUNDLICH; CASADEVALL, 1994; SPITZER et al.,1993), também foram utilizadas para avaliar a variabilidade de *C. neoformans*.

O seqüenciamento de genes específicos tem sido utilizado para detectar polimorfismos em *C. neoformans*. Casadeval et al. (1992) estudando o gene de cópia única URA5 mostraram a existência de substituições extensivas de pares de bases, em isolados individuais e nas

variedades *neoformans* e *gattii*, atingindo 6% dos nucleotídeos da seqüência codificadora. Nakamura et al. (2000), analisando a seqüência de um fragmento de 597 pb do gene CAP59, o qual contém 30% das seqüências que codificam proteínas que são responsáveis pela produção da cápsula polissacarídica dessa levedura (CHANG; KWON-CHUNG, 1994) conseguiram diferenciar os cinco diferentes sorotipos de *C. neoformans*. A análise das regiões ITS (seqüência espaçadora interna transcrita) incluindo a seqüência do gene 5,8 rRNA, delineou 7 genotipos dentro das três variedades de *C. neoformans*, através da combinação de 8 nucleotídeos localizados nas posições 10, 11, 15, 19, 108 da região do ITS1, na posição 221 da região do 5,8S e nas posições 298 e 346 da região do ITS2 (KATSU et al., 2004).

A genotipagem utilizando a técnica de AFLP tem sido utilizada para avaliar as estruturas genéticas dessa levedura. Através dessa técnica, Trilles et al. (2003) e Barreto de Oliveira et al. (2004) avaliaram a diversidade genética das cepas de *C. neoformans* isoladas em alguns estados brasileiros, além de utilizar novas combinações de iniciadores para caracterizar tipos sexuais e sorotipos através da técnica de PCR (KWON-CHUNG et al., 2003; BARRETO DE OLIVEIRA et al., 2004). Em outra análise, Halliday et al. (1999) utilizaram iniciadores específicos para os genes STE12 α e MF α de *C. neoformans* var. *gattii* para determinar a presença dos dois tipos sexuais em isolados clínicos da Austrália.

A técnica de PCR *fingerprinting* baseia-se na utilização de iniciadores específicos para regiões de microssatélites/minissatélite ou seqüências repetitivas simples. Meyer et al. (1999), utilizando essa técnica, caracterizaram 400 amostras clínicas e ambientais de *C. neoformans* e verificaram a existência de 8 grupos ou subtipos moleculares denominados: VNI (var. *grubii*, sorotipo A), VNII (var. *grubii*, sorotipo A), VNIII (sorotipo AD), VNIV (var. *neoformans*, sorotipo D), VGI, VGII, VGIII e VGIV (var. *gattii*, sorotipo B e C). Estudos posteriores revelaram a ausência de correlação entre os sorotipos B e C e os grupos moleculares de *C. neoformans* var. *gattii*.

Um estudo desenvolvido por Horta et al. (2002) utilizando a técnica de RAPD para analisar a variabilidade genética de isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* do Estado do Rio Grande do Sul distinguiu duas classes fenotípicas entre os isolados clínicos, classe (F) sorotipo A e classe (G) sorotipo B. Katsu et al. (2004) estudando a variabilidade genética de 96 isolados de *C. neoformans* var. *gattii*, através da técnica de RAPD, mostraram que os sorotipos B e C foram agrupados em três subtipos moleculares.

Com o seqüenciamento do genoma da cepa JEC21 sorotipo D de *C. neoformans* var. *neoformans*, foi possível prever o tamanho do genoma que é de 19 Mb, excluindo as regiões de repetição do DNA ribossomal que constitui aproximadamente 5% do genoma. O genoma desse fungo possui 14 cromossomos que variam de tamanho entre 762 Kb a 2,3Mb, num total de 6.572 genes codificantes para proteínas, contendo uma média de 6,3 exons de 255 pb e 5,3 introns de 67 pb. A média de tamanho dos transcritos é de 1,9Kb contendo uma média de 15% de seqüências não codificantes. O genoma de *C. neoformans* é rico em transposons, sendo estes localizados em grupos no centrômero podendo levar a instabilidade cariotípica e variações fenotípicas, acarretando assim, os polimorfismos entre os genomas (LOFTUS et al., 2005).

1.6 Tratamento e resistência

O primeiro medicamento efetivo para o tratamento da criptococose, introduzido no final da década de 50, foi a anfotericina B, agente antifúngico que atua na inibição da ligação do ergosterol da membrana plasmática do fungo, aumentando assim, a permeabilidade de prótons e cátions monovalentes como o potássio. A anfotericina B levou a cura de aproximadamente 50% dos pacientes com criptococose sem associação com o HIV. Segundo recomendações do CDC (2004), as doses podem ser de 0,7-1 mg/kg/dia (AULAKH;

STRAUSS; KWON-CHUNG, 1981; BOTTONE; WORMSER, 1986; BOZZETTE et al., 1991; BICANIC; HARRISON, 2005). A nefrotoxicidade deste fármaco é um problema que está sendo reduzido com a utilização de solução salina (AULAKH; STRAUSS; KWON-CHUNG, 1981; BOLAÑOS; MITCHELL, 1989; BICANIC; HARRISON, 2005). Alternativamente, formulações lipídicas como a anfotericina B lipossomal, estão sendo utilizadas com resultados efetivos, com menor nefrotoxicidade do que a anfotericina B convencional (KOTWANI et al., 2001).

O desenvolvimento da flucitocina (5-fluorocitosina [5FC]), na década de 70, como uma droga antitumoral e sua introdução como agente antifúngico veio a complementar a terapia anticriptocócica. A sua ação nos *C. neoformans* se dá através da conversão da droga pela citocina deaminase (enzima presente na célula fúngica) para 5-fluororacil 5-FU, uma pirimidina análoga que inibe a síntese de ácido nucleicos fúngicos (BICANIC; HARRISON, 2005) sendo recomendados 100mg/kg/dia (CDC, 2005) A combinação dessas duas drogas revolucionou a terapia da meningite criptocócica, reduzindo a letalidade de 100% para aproximadamente 25 a 30%. No final da década de 80, a introdução de novos agente antimicóticos triazóis, de uso oral, como o fluconazol e o itraconazol, inibidores da síntese de ergosterol, com uma excelente absorção e penetração no LCR, colaborou com o tratamento da criptococose, sendo recomendadas as doses de 400mg/dia, via oral, de fluconazol ou itraconazol. No entanto, para o tratamento da criptococose, o fluconazol mostrou-se superior em relação ao itraconazol (AULAKH; STRAUSS; KWON-CHUNG, 1981. BOTTONE; WORMSER, 1986; BOZZETTE et al., 1991; BICANIC; HARRISON, 2005).

Usualmente em pacientes com AIDS, para tratar a fase inicial da meningite criptocócica, é usada anfotericina B, dose de 0,7mg/kg/dia, combinad, com flucitocina 100mg/Kg/ dia, por duas semanas seguido de 400mg/dia de fluconazol oral por 8 semanas. Esse tratamento está associado com menos de 10% de mortalidade e a resposta antimicótica é

de aproximadamente 70% (VAN DER HORST et al., 1997; SAAG, et al., 2000), mas recorrências são bastante comuns em 50 a 75% quando a terapia é interrompida (SAAG, et al., 2000; PAPPALARDO; MELHEM, 2004). Para a fase de manutenção são administradas doses menores, em geral 200 mg/dia de fluconazol oral, e com esse regime medicamentoso, a mortalidade em pacientes com AIDS e meningite criptocócica diminuiu de 14- 25% para 6% (SAAG, et al., 2000, PAPPALARDO; MELHEM, 2004). Um estudo desenvolvido por Pfaller et al. (2005) avaliaram a susceptibilidade *in vitro* de 1.811 isolados clínicos de *C. neoformans*, obtidos de 100 laboratórios de cinco diferentes regiões geográficas, de todo o mundo, entre os anos de 1990 a 2004, frente aos antifúngicos anfotericina B, flucitocina, fluconazol, variconazole, posaconazole e ravuconazole e concluíram que a resistência *in vitro* entre os isolados de *C. neoformans* a esses antifúngicos não aumentou nestes 15 anos.

Já no Brasil, um estudo desenvolvido em Goiânia avaliou a susceptibilidade *in vitro* das variedades de *C. neoformans* de pacientes com AIDS, mostrando que todas as amostras do sorotipo A e D foram susceptíveis a anfotericina B e ao itraconazol e 98,2% ao fluconazol. Já o sorotipo B apresentou resistência de 75% ao fluconazol demonstrando, assim, importância para o clínico na escolha do medicamento e do esquema terapêutico a ser empregado no tratamento (PAPPALARDO; MELHEM, 2004; FERNANDES et al., 2003).

1.7 Epidemiologia

A prevalência da infecção por *C. neoformans* em uma determinada população parece estar relacionada ao número de indivíduos imunocomprometidos e ao grau de exposição à levedura (CHEN et al., 2000). Diferentes inquéritos epidemiológicos mostram a distribuição heterogênea dos subtipos de *Cryptococcus* em vários países e sugerem uma correlação entre a variedade do fungo e a região geográfica (MELO et al., 1993). A var. *grubii* está distribuída

por todo o mundo, enquanto que a var. *gattii* é mais freqüentemente encontrada nas regiões tropicais e subtropicais (KWON-CHUNG; BENNETT, 1984). Recentemente, a var. *gattii* foi identificada infectando humanos em Vancouver, Canadá (KIDD, et al., 2004). A var. *neoformans* é isolada freqüentemente na Europa e América do Sul (MITCHEL; PERFECT, 1995), mas também tem sido isolada nos Estados Unidos (LITVINTSEVA et al., 2005).

Considerando as infecções oportunistas que acometem pacientes com AIDS em todo o mundo, a criptococose é a quarta causa mais freqüente de infecção, com índices de aproximadamente 2 a 7% nos Estados Unidos, no oeste da Europa e na Austrália (CURRIE; CASADEVALL, 1994; POWDERLY, 1993) e 15 a 30% na África. No Brasil, 4,5% das infecções em pacientes com AIDS são causadas por *C. neoformans* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002; CASALI et al., 2003). Dados da Divisão Epidemiológica do Instituto de Infectologia Emílio Ribas, São Paulo, demonstraram que a neurocriptococose em pacientes com AIDS, nos últimos anos, diminuiu de 7,7% em 1995 para 3,1% em 2001 (PAPPALARDO; MELHEM, 2004).

Na população mundial, quase todo o caso de criptococose em pacientes com AIDS é causado pelo *C. neoformans* var. *grubii*, sorotipo A, mesmo em áreas endêmicas para *C. neoformans* var. *gattii*. Entretanto, entre os anos de 1990 e 1992, *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) foi mais prevalente nos pacientes com AIDS na França (DROMER et al., 1994). Nos países Ibero-Americanos (Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, México, Peru, Venezuela, Guatemala e Espanha), a incidência dos sorotipos e variedades nos isolados clínicos, veterinários e ambientais de *C. neoformans* foi de 73,8% para a variedade *grubii*, sorotipo A, de 4,1% para o híbrido, sorotipo AD, de 1,8% para a variedade *neoformans*, sorotipo D e de 20,3% para a variedade *gattii*, sorotipos B e C (MEYER et al., 2003).

Segundo Barreto de Oliveira e colaboradores (2004), a diversidade genotípica de *C. neoformans* no Brasil é majoritariamente distribuída em variedade *grubii*, sorotipo A (65%),

variedade *gattii*, sorotipo B (17,5%), variedade *neoformans*, sorotipo D (9%), híbrido sorotipo AD (5%) e variedade *gattii* sorotipo C (3,5%). Corroborando outros estudos, Nishikawa et al. (2003) encontraram o sorotipo A (var. *grubii*), no Brasil, como sendo a mais prevalente em pacientes HIV positivos e o sorotipo B (var. *gattii*) o mais abundante entre pacientes HIV negativos. Estudos desenvolvidos em Goiânia, em pacientes com AIDS, demonstraram ser o *C. neoformans* sorotipo A o agente mais prevalente de criptococoses (FERNANDES et al., 2003).

Em São Paulo, entre os anos 1996 e 2000, 65% dos pacientes imunocompetentes com criptococose apresentaram a variedade *grubii* (sorotipo A) e 35% a variedade *gattii* (sorotipo B). Já em pacientes com AIDS, 98,1% apresentaram a variedade *grubii* (sorotipo A) e 1,9% a variedade *gattii* (sorotipo B). Destes isolados, 89% apresentaram *C. neoformans* com tipo sexual MAT α (OHKUSU et al., 2002. Entre 1995 e 2002, foram notificados pela Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul, 549 casos de criptococose. Acredita-se que esse número pode ser maior, uma vez que essa doença não é de notificação compulsória. Segundo Casali et al. (2003), a variedade de *C. neoformans* mais freqüentemente encontrada entre as amostras estudadas desse Estado, foi a *grubii* sorotipo A, MAT α).

De acordo com o Boletim do Ministério da Saúde de 2002, a incidência de AIDS por 100.000 habitantes no Estado de Santa Catarina, atinge valores da ordem de 108 casos em Itajaí, 78 casos em Balneário Camboriú, 50 casos em Biguaçu, Florianópolis e Rio do Sul, 44,3 em Joinville e de 42,4 em São José. O Hospital Nereu Ramos (HNR), criado com objetivo de realizar o tratamento de portadores de tuberculose e outras doenças infecciosas, em 1987, sendo reconhecido pelo Ministério da Saúde como Centro de Referência Estadual para o tratamento dos portadores do HIV. Embora seja um hospital de referência não possui laboratório próprio para diagnóstico das patologias associadas a esse tipo de paciente, sendo os exames realizados por laboratórios terceirizados e pelo Laboratório de Micologia da

Universidade Federal de Santa Catarina e Laboratório Central do Estado (LACEN). Segundo estudo desenvolvido por Dutra et al. (2005), no período entre julho de 2003 a junho de 2005, o LACEN recebeu, de diferentes unidades de saúde do Estado, 265 amostras com suspeita clínica de criptococose das quais, 160 amostras foram positivas em uma das técnicas (coloração por tinta da China, aglutinação em látex ou cultura em meio ágar sabouraud) e 105 amostras negativas (DUTRA et al., 2005).

Embora os estudos realizados no Estado do Rio Grande do Sul e em outras unidades da Federação mostrem a predominância de *C. neoformans* var. *grubii* em pacientes com AIDS, em Santa Catarina não existem dados sobre o sorotipo ou grupo molecular da espécie *C. neoformans* que afeta os pacientes com AIDS. No presente estudo, avaliou-se a variabilidade genética das amostras de *C. neoformans* isoladas de pacientes com AIDS no Estado de Santa Catarina.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a variabilidade genética de amostras de *Cryptococcus neoformans* isoladas de pacientes HIV positivos atendidos no Hospital Nereu Ramos de Florianópolis, Santa Catarina.

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar a extração do DNA genômico das amostras de *C. neoformans* isoladas de pacientes HIV positivos.
- Padronizar a reação da PCR para amplificação do fragmento do gene CAP59 das amostras *C. neoformans* isoladas de pacientes HIV positivos.
- Determinar os sorotipos das cepas isoladas de amostras clínicas, através do perfil de restrição de produtos de amplificação do fragmento do gene CAP59.
- Determinar os padrões moleculares das amostras isoladas, utilizando a técnica da PCR *fingerprinting*.
- Avaliar a variabilidade genética das cepas de *C. neoformans*, através da técnica de RAPD.
- Seqüenciar o fragmento do gene CAP59 amplificado via PCR de algumas amostras de *C. neoformans* isoladas de pacientes HIV positivos e comparar as seqüências obtidas com seqüências de *C. neoformans* já disponíveis no Genbank.

3.0 METODOLOGIA

3.1 Considerações Éticas

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Pesquisa em Seres Humanos da UFSC (Parecer nº 233/04).

3.2 Pacientes

As amostras de líquor foram obtidas dos pacientes portadores de HIV atendidos no Hospital Nereu Ramos, Município de Florianópolis, Estado de Santa Catarina, que estiveram internados no período de janeiro de 2004 a junho de 2005. A coleta de líquor foi efetuada através de punção lombar pelos médicos responsáveis. As amostras de líquor foram encaminhadas imediatamente, em frasco estéril de 10 ml, para o laboratório de Micologia do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e Laboratório Central de Santa Catarina (LACEN-SC), onde foram analisados através do teste de coloração pela tinta da China, aglutinação em látex e realizado os isolamentos do fungo. Para isolamento de *C. neoformans*, as amostras de líquor foram semeadas em ágar sabouraud e mantidas a temperatura de 28°C por 48 a 72 horas. Amostras indefinidas foram determinadas pelo método de produção de urease. Trinta e cinco amostras em cultura (am. 26, am. 39, am. 41, am. 45, am.48, am.60, am. 70, am. 77, am.92, am.137, am.146, am.163, am.165, am.166, am.167, am.169, am.191, am. 206, am. 211, am. 215, am. 236, am. 258, am. 20/74, am.13/96, am. 05/47, am.02/56, am. 06/48, am. HU19087, am. HU17990, am. 09/63, am.09/252, am.11/193, am.13/120, am. 17/29, am. 01/183) e 16 amostras de líquor foram enviadas para a realização do presente estudo.

Dados relativos ao sexo, idade, cor, naturalidade, residência e doença concomitante dos 35 pacientes foram obtidos nos prontuários no Hospital Nereu Ramos sob supervisão da Dr^a. Ivete Ioshiko Masukawa.

3.3 Origem das amostras

Como controles positivos foram utilizadas amostras de referência de *C. neoformans* sorotipos: A (ATCC-LMM794), B (ATCC-LMM799), C (ATCC-LMM801), D (ATCC-LMM797) e AD (ATCC-LMM796), cedidas pelo Laboratório de Micologia da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. Além disso, 33 amostras do sorotipo A (HC1, HC2, HC4, HC5, HC6, HC7, A1, A2, A3, A4, A6, Az1, Az4, Az8, Az15, Az38 e A32045), sorotipo B (AL6, AL10, AL11, AL12, AL32, AL33, AL34 e Az13), sorotipo D (A42, A43, A45, A46, A48 e D28958) e sorotipo AD (AD48184) e de diferentes sorotipos previamente caracterizadas através do *kit* comercial Crypto Check ® (Iatron, Tokyo, Japan) e da técnica PCR *fingerprinting* (MEYER et al., 1999) foram gentilmente cedidas pela Dr^a. Marilene Henning Vainstein do Laboratório de Biologia de Fungos de Importância Médica e Biotecnologia do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. Como controles negativos foram utilizadas amostras de outras espécies de fungos leveduriformes *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, cedidas laboratório de Micologia do Departamento de Análises Clínicas da UFSC e *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis*, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo.

As amostras foram cultivadas em meio CG (Circle Grow medium-USB[®]) a 37°C por 24 a 48 horas, preservadas em massa celular à temperatura de -20°C e criopreservadas a -80°C em meio CG contendo 30% de glicerol.

3.4 Extração de DNA genômico

Para a extração do DNA genômico de *C. neoformans* testaram-se 12 protocolos descritos na literatura, tendo sido introduzidas algumas modificações em alguns desses protocolos (Tabela 3). Os protocolos testados estão descritos detalhadamente nos itens a seguir. Para todos os protocolos foi utilizada a mesma concentração celular. Para tanto, as amostras foram cultivadas em meio CG (Circle Grow medium-USB[®]) por 16 horas à 37°C numa rotação de 150 rpm, 1 ml de cultura com D.O₆₀₀ de 2,0 foi transferido para tubos de microcentrífuga de 1,5 ml e centrifugado a 5.000 x g durante 10 min. E, após a retirada do sobrenadante os tubos contendo o sedimento celular foram mantidos a -20°C até o momento de seu uso.

3.4.1 Protocolo – 1

O DNA genômico foi extraído utilizando-se uma modificação da técnica. Para isso, foram adicionados ao sedimento celular 500 µl de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 / EDTA 10 mM pH 8,0 / 2-Mercaptoetanol 1% e contendo 1% de Liticase (Sigma[®]) e incubado-se a 30°C por 12 horas. A seguir, foram adicionados 200 µl de tampão (Triton X-100X-100 2% / SDS 1%) e 200 mg de pérolas de vidro (0,45 mm de diâmetro) e 700 µl de fenol-clorofórmio (v/v). Os tubos foram agitados vigorosamente em vórtex por 5 min. e centrifugados a 13.000 x g / 15 min, o sobrenadante coletado e o DNA precipitado com etanol absoluto a -70°C por 1

h. Ao DNA foram adicionados 200 µl de TE (10 mM Tris pH 8,2 / 1 mM EDTA pH 8,0) contendo RNase A (Sigma[®]), na concentração de 50 µg/ml incubado-se a 37°C por 30 min. Uma nova extração fenol-clorofórmio foi realizada e o DNA precipitado em isopropanol 100% v/v e lavado uma vez com etanol 70%.

3.4.2 Protocolo – 2

Neste procedimento, o DNA genômico foi extraído conforme técnica descrita por Nakamura et al. (2000). Ao sedimento celular foram adicionados 500 µl tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0 / EDTA 1 mM pH 8,0 / SDS 10% contendo 5mg/ml de lisozima (Sigma[®]) a 30°C por 12 horas. A seguir, adicionou-se 1µl de RNase A (Sigma[®]) 10mg/ml e incubou-se a amostra a 30°C por 1 hora. Após esse período adicionaram-se 200µg/ml de proteinase K e a amostra foi incubada a 42°C por 1 hora. A este volume foi adicionado igual volume de fenol-clorofórmio (v/v), os tubos foram invertidos por 10 min. e centrifugados a 13.000 x g / 10 min.. A fase aquosa foi coletada e submetida a um novo passo de extração com clorofórmio. A seguir, a fase aquosa foi coletado e o DNA precipitado pela adição de acetato de sódio 5M na proporção de 1/10 de volume e 2,5 volume de etanol puro.

3.4.3 Protocolo – 3

Utilizou-se uma modificação das técnicas descritas por Del Poeta et al. (1999) e Casali et al. (2003). Ao sedimento celular adicionaram-se 500 µl de tampão (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 / EDTA 1 mM pH 8,0 / Triton X-100 2%/ SDS 1%), um volume de 200mg de pérolas de vidro (0,45 mm de diâmetro) e 500 µl de fenol-clorofórmio (v/v). Os tubos foram agitados vigorosamente em vórtex por 10 min., centrifugados a 13.000 x g por 10 min e a fase aquosa

foi coletada e acrescida de 1 volume de etanol absoluto gelado sendo mantida a -70°C por 30 min.. Ao DNA foram adicionados de 200 μl de TE (10 mM Tris pH 8,2 / 1 mM EDTA pH 8,0) contendo RNase A (Sigma[®]) na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ incubando-se a 37°C por 30 min. Uma nova extração fenol-clorofórmio foi realizada e o DNA precipitado conforme descrito no Protocolo 2.

3.4.4 Protocolo – 4

O DNA genômico foi extraído conforme modificações da técnica descrita por Drivinya, Shimizu e Takeo (2004) com modificações. Resfriou-se o sedimento celular a -80°C por 15 min. e liofilizou-se por 3 horas. Adicionaram-se então, um volume de 0,2 ml pérolas de vidro (0,45 mm de diâmetro), os tubos foram agitados vigorosamente em vórtex por 10 min., quando acrescentaram-se 500 μl de tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,5 / EDTA 1 mM pH 8,0 / Triton X-100 2% / SDS 1% e 500 μl de fenol-clorofórmio (v/v). Os tubos foram, então, centrifugados a $13.000 \times g$ por 20 min., sendo a fase aquosa coletada e o DNA precipitado como descrito no Protocolo 2.

3.4.5 Protocolo – 5

O DNA genômico foi extraído utilizando-se uma modificação da técnica Bialek et al. (2000). Ao sedimento celular adicionaram-se 500 μl tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,5 / EDTA 1 mM pH 8,0 / Triton X-100 2% / SDS 1% e, após homogeneização em vórtex, a amostra foi fervida por 5 min. a 100°C e resfriada em nitrogênio líquido por 1 min.. Esta etapa foi repetida 5 vezes. A seguir, adicionou-se um volume de 200mg de pérolas de vidro (0,45 mm de diâmetro) e 500 μl de fenol-clorofórmio (v/v) agitando-se vigorosamente em vórtex por 5

min. e centrifugando-se a 13.000 x g / 10 min. A fase aquosa foi coletada e submetida a uma nova extração com clorofórmio e o DNA precipitado como descrito no Protocolo 2.

3.4.6 Protocolo – 6

Extraíu-se o, DNA genômico, utilizando-se uma modificação da técnica de Fujimura e Sakuma (1993) descrita por Toffaletti et al. (2004). Ao sedimento celular foram adicionados de 500 µl tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 / EDTA 20 mM pH 8,0 / SDS 1%, 200 mg de pérolas de vidro (0,45 mm mm de diâmetro) e 500 µl de fenol-clorofórmio (v/v). Os tubos foram agitados vigorosamente em vórtex por 5 min., resfriados em nitrogênio líquido por 2 min. e imediatamente incubados a 70°C por 10 min.. A essa mistura adicionaram-se 200 µl de solução de acetato de potássio 5M e 150 µl de cloreto de sódio 5M, incubando-se à temperatura ambiente por 20 min. Seguido de centrifugação a 13.000 x g por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, onde foi adicionado 1 µl de RNase A (Sigma[®]) (20mg/ml) e incubou-se à 37°C por 15 min.. A esta mistura adicionou-se 1/3 do volume de polietilenoglicol 8000 a 30% (PEG8000) e as amostras foram mantidas a -196°C por 10 min.. O DNA foi precipitado pela adição de etanol puro.

3.4.7 Protocolo - 7

O DNA genômico foi extraído conforme a técnica descrita por Varma e Kwon-Chung (1991). Ao sedimento celular foram adicionados 500 µl tampão (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 / EDTA 0,45M pH 8,0 / Sarcosil 1%/ 2mg/ml de Proteinase K) e a amostra foi fervida por 15 min. a 100°C. Adicionaram-se, então 200 µl de pérolas de vidro (0,45 mm de diâmetro) e 500 µl de fenol-clorofórmio (v/v). A mistura foi agitada vigorosamente em vórtex por 5 min. e

centrifugada a 13.000 x g por 10 min., sendo a fase aquosa coletada e acrescida de 1 volume de etanol absoluto gelado e em seguida foi mantida a -70°C por 30 min.. O DNA coletado após centrifugação a 13.000 x g, por 15 min., foi adicionado de 200 µl de TE (10 mM Tris pH 8,2 / 1 mM EDTA pH 8,0) contendo RNase A (Sigma[®]) na concentração de 50 µg/ml e incubado a 37°C por 30 min. Após um novo passo de extração fenol-clorofórmio o DNA foi precipitado conforme descrito no Protocolo 2.

3.4.8 Protocolo - 8

O DNA genômico foi extraído conforme procedimento descrito por Katsu et al. (2004). Ao sedimento celular foram adicionados 500 µl tampão de GPT (6 M guanedinatioceanoato dissolvida em 50mM de Tris – HCL pH 8,3) e 500 µl de fenol, misturando-se durante 5 min.. A amostra foi fervida por 15 min. a 100°C e ,em seguida, adicionaram-se 250 µl de clorofórmio/ álcool amílico (24/1), a mistura foi agitada vigorosamente em vórtex por 5 min. e centrifugada a 13.000 x g por 5 min. A fase aquosa foi coletada e o DNA precipitado como descrito no Protocolo 2.

3.4.9 Protocolo – 9

O DNA genômico foi extraído segundo o protocolo utilizado no Laboratório de Micologia da Fiocruz. Ao sedimento celular foram adicionados 500 µl tampão (Tris-HCl 50 mM pH 7,5 / EDTA 10 mM pH 8,0 / 2-Mercaptoetanol 1% e Liticase (Sigma[®]) 1%) Tris-HCl 10 mM pH 7,5 / EDTA 1 mM pH 8,0 / NaCl 200 mM) a 30°C /12 horas em agitação constante. A seguir adicionaram -se 100 µl de SDS 1% e a amostra foi incubada a 65°C por 30 min.. Adicionaram-se então, 10 µl de RNase A (Sigma[®]) na concentração de 10 mg/ml e a

amostra foi incubada a 37°C / 30 min. O DNA foi extraído pelo método do fenol-clorofórmio (v/v), e precipitado como descrito no Protocolo 2.

3.4.10 Protocolo – 10

Nesta etapa, utilizou-se uma modificação da técnica descrita por Bolano et al. (2001) com modificações. Ao sedimento celular foram adicionados 1,5 ml de tampão Uréia (Uréia 8M/ NaCl 0,5 M/ Tris-HCl 20 mM pH 7,5 / EDTA 20 mM pH 8,0 / 2% de SDS) , colocando-se sob agitação branda à temperatura ambiente por 3 horas. As amostras foram centrifugadas 5.000 x g por 10 min. A seguir, adicionaram-se 400 µl de tampão (0,5% SDS/ 0,5% Sarcosil/ Tris-HCl 20 mM pH 7,5 / EDTA 10 mM pH 8,0), 400 µl de fenol-clorofórmio (v/v) e 200 µl de pérolas de vidro (0,45 mm de diâmetro). A amostra foi submetida à agitação em vórtex por 3 min. com descanso de 3 min, sendo esta etapa repetida três vezes. Essa amostra foi centrifugada a 13.000 x g, por 15 min, coletando-se a fase aquosa e o DNA foi precipitado como descrito no Protocolo 2.

3.4.11 Protocolo – 11

O DNA genômico foi extraído conforme uma outra modificação da técnica descrita por Casali et al. (2003). Ao sedimento celular foi adicionado 500 µl de tampão (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 / EDTA 1 mM pH 8,0 / Triton X-1002%/ SDS 1%) e submetido a sonicação por 15 segundos a 20 Hz com intervalo de 1 min.em banho de gelo, sendo esse processo repetido 3 vezes. A seguir, adicionaram-se 200 mg de pérolas de vidro (0,45 mm de diâmetro) e 500 µl de fenol-clorofórmio (v/v), agitou-se vigorosamente em vórtex por 10 min. e centrifugou-se a 13.000 x g por 10 min.. A fase aquosa foi coletada, adicionou-se 1 volume de etanol absoluto

gelado e foi mantida a -70°C / 30 min.. O DNA foi coletado por centrifugação, adicionaram-se de 200 μl de TE (10 mM Tris pH 8,2 / 1 mM EDTA pH 8,0) contendo RNase A (Sigma[®]) na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, e incubou-se a 37°C por 30 min. Após uma nova extração fenol-clorofórmio o DNA foi precipitado como descrito no Protocolo 2.

3.4.12 Protocolo – 12

O DNA genômico foi extraído conforme descrito por Casali et al. (2003) com modificações. O sedimento celular recebeu 500 μl de tampão (Tris-HCl 50 mM pH 7,5 / EDTA 10 mM pH 8,0 / 2-Mercaptoetanol 1% e Liticase (Sigma[®]) 1%) e incubado a 30°C por 12 horas. A seguir foram adicionados 200 μl de tampão (Triton X-100 2% / SDS 1%) e 200 mg de pérolas de vidro (0,45 mm de diâmetro) e a amostra foi fervida por 30 min.. Adicionou-se então, 500 μl de fenol-clorofórmio (v/v) e a amostra agitada vigorosamente em vórtex por 5 min., sendo posteriormente centrifugada a 13.000 x g por 10 min. A fase aquosa foi coletada e submetida a uma nova extração com clorofórmio e o DNA precipitado como descrito no Protocolo 2.

Tabela 3 - Representação dos protocolos utilizados para a Extração de DNA genômico.

Protocolos	Lise celular	Extração	Precipitação	Dosagem
1	Tampão Liticase® + Triton X-100X-100 2% / SDS 1% + pérolas de vidro	Fenol/clorofórmio (v/v) centrifugados a 13.000 x g / 10 min, e a fase aquosa foi coletada e submetida a um novo passo de extração com clorofórmio	Adição de 1/10 do volume de acetato de sódio 5M e 2,5 volume de etanol 100%.	Gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídio+ grau de pureza das amostras determinado pela relação da absorvância a 260/280 nm
2	SDS 10% + Tampão Lisosima®+ Proteinase K®			
3	Triton X-100 2%/ SDS 1% + pérolas de vidro			
4	Resfriado a -80°C + liofilizado por 3 horas + Triton X-100 2%/ SDS 1% + pérolas de vidro			
5	Triton X-100 2%/ SDS 1% + aquecido à 100°C + resfriado à - 196°C + pérolas de vidro			
6	SDS 1% + pérolas de vidro+ resfriados à -196 °C + incubados à 70°C + acetato de potássio + (PEG8000)+ resfriar -196°C			
7	Sarcosil 1% + Proteinase K+ aquecido à 100°C + pérolas de vidro			
8	Tampão GPT + + aquecido à 100°C + vórtex			
9	Tampão Liticase® + incubado à 30°C/ 12 horas + SDS 1%+ incubadas à 65°C			
10	Uréia 8M + incubados à 3 horas sob temperatura de 25°C + 0,5% SDS/ 0,5% Sarcosil + pérola de vidro			
11	Triton X-100 2%/ SDS 1%+ sonicação à 20 Hz + banho de gelo + pérolas de vidro			
12	Tampão Liticase® + incubado à 30°C/ 12 horas + Triton X-100 2% / SDS 1% + pérolas de vidro + aquecido à 100°C + vórtex®.			

3.4.13 Eluição, visualização e armazenamento das amostras

Após a extração, o DNA de todas as amostras recebeu de 50 µl de água ultrapura estéril e foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídio, sendo a observação das bandas realizada com o auxílio do transiluminador Macro Vue UV 20[®] (Hofer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco). A dosagem do DNA foi determinada em espectrofotômetro Ultrospec[®] 3000 (Pharmacia Biotech, Upsalla) e o grau de pureza das amostras determinado pela relação da absorbância a 260/280 nm. Após a quantificação, as amostras de DNA foram aliqüotadas e armazenadas a - 20°C até o momento do seu uso.

3.5 Amplificação do fragmento do gene CAP59

A amplificação do fragmento do gene CAP59, a partir do DNA genômico, foi feita em termociclador Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburg[®]) conforme descrito por Nakamura et al. (2000). As reações foram realizadas com volume final de 20 µl utilizando-se 1 U da enzima *Taq* DNA polimerase (LabTrade[®]), 2 mM de cada dNTP, 10 pmol de cada iniciador (CAP59F 5'-GAG TGT CTC CGC AAC CCG CA-3' e CAP59R 5'-CCT ACT CTG CCA AAT CAA CTC-3') e 10 ng/ µl de DNA molde ou 3 µl das amostras de líquido ou 3 µl de cultura em um tampão contendo 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂. Independentemente do protocolo de extração de DNA, a amplificação do fragmento do gene CAP59 de todas as amostras foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 min., seguida de 35 ciclos a 94°C por 1 min., ligação do iniciador a 60°C por 2 min., extensão a 72°C por 3 min. e uma extensão final a 72°C, durante 5 min..

3.6 Determinação da especificidade da reação de amplificação do fragmento do gene CAP59 a partir de DNA genômico

Para determinar a especificidade dos oligonucleotídeos CAP59F e CAP59R na amplificação do fragmento do gene CAP59, utilizaram-se o DNA da cepa LMM794 de *C. neoformans* e amostras das outras espécies de fungos leveduriformes: *C. parapsiloris*, *C. krusei*, *H. capsulatum* e *P. brasiliensis*. A metodologia para a realização da técnica da PCR está descrita no item 3.5. A presença ou ausência de amplificação do fragmento de 597pb e/ou de outros fragmentos nas diferentes amostras de fungos leveduriformes foram verificadas em gel de agarose 1,5%.

3.7 Determinação da sensibilidade da reação de amplificação do fragmento do gene CAP59 a partir de DNA genômico

A sensibilidade da reação de amplificação do fragmento do gene CAP59 foi avaliada utilizando-se o DNA da cepa LMM794 de *C. neoformans*. O DNA na concentração inicial de 24ng/ μ l, foi diluído na razão de 10 até 0,00002 ng/ μ l, tendo sido utilizados 3 μ l de cada diluição na reação de amplificação em um volume final de 20 μ l, como descrito no item 3.5. A sensibilidade foi definida através da última diluição que se pode visualizar o produto de 597pb da reação de PCR do fragmento do gene CAP59 em gel de agarose 1,5%.

3.8 Preparação das amostras de cultura para a reação de amplificação do fragmento do CAP59 em amostras de cultura

Para tanto, as amostras foram cultivadas em meio CG (Circle Grow medium-USB[®]) por 16 horas á 37°C numa rotação de 150 rpm, 1 ml de cultura com D.O₆₀₀ de 2,0, foi transferido para o tubo de microcentrífuga de 1,5 ml e centrifugado a 5.000 x g durante 10 min., o sobrenadante foi descartado adicionando-se 500 µl de água ultrapura estéril ao sedimento. A seguir, 3 µl da suspensão celular foram utilizados como DNA molde na reação de amplificação como descrito no item 3.5. Os resultados foram avaliados através da visualização do produto de 597pb da reação de PCR do fragmento do gene CAP59 em gel de agarose 1,5%.

3.9 Determinação da sensibilidade da reação de amplificação do fragmento do gene CAP59 diretamente de amostras da cultura

Para verificar a sensibilidade da reação de amplificação do fragmento do gene CAP59 utilizaram-se amostras direto de cultura celular, crescido conforme descrito no item 3.8, com D.O₆₀₀ 2,0 diluída em água ultrapura estéril, na razão de 2 até atingir uma D. O. de 0,0006. A seguir, 3 µl da suspensão celular foram utilizados como DNA molde na reação de amplificação como descrito no item 3.5. A sensibilidade foi definida através da última diluição em que se pode visualizar o produto de 597pb da reação de PCR do fragmento do gene CAP59 em gel de agarose 1,5%.

3.10 Preparação das amostras direto do líquido para a reação de amplificação do fragmento do CAP59

Das 16 amostras clínicas positivas de líquido, cerca de 200 a 300 µl de líquido, foram centrifugadas a 13.000 x g por 5 min. Adicionando-se, em seguida, 50 µl de água ultrapura estéril e 3 µl da suspensão celular submetida à amplificação como descrito no item 3.5. Os resultados foram avaliados através da visualização do produto de 597pb da reação de PCR do fragmento do gene CAP59 em gel de agarose 1,5%.

3.11 Avaliação da interferência da anfotericina B na amplificação do fragmento do CAP59 em amostras de cultura

Quarenta e cinco microlitros de cultura da cepa LMM794 em meio CG crescido conforme item 3.8, com D.O₆₀₀ de 0,05 foram transferidas para um tubo de microcentrífuga de 0,6 ml e adicionaram-se 45 µl de água ultrapura estéril contendo anfotericina B (GIBCO®) em concentrações decrescentes de 250µg/ml a 0,18 µg/ml. Os tubos foram incubados a 37°C por 24 horas e 3 µl da cultura foram diretamente submetidos à amplificação do fragmento do gene CAP59, como descrito no item 3.5. Os resultados foram avaliados através da visualização do produto de 597pb da reação de PCR do fragmento do gene CAP59 em gel de agarose 1,5%.

3.12 Identificação dos sorotipos das amostras padrões e das amostras clínicas de *Cryptococcus neoformans* através da reação de PCR-RFLP

Aproximadamente 1 ml de cultura ($D.O_{600} = 0,2$) crescida conforme descrito no item 3.8, das amostras clínicas de *C. neoformans* foi transferido para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml e centrifugado a $5.000 \times g$ por 10 min.. Após a adição de 500 μ l de água ultrapura estéril, 3 μ l da suspensão foram submetidos à reação de PCR para amplificação do fragmento do gene CAP59 como descrito no item 3.3, sendo os produtos de amplificação visualizados conforme descrito no item 3.4.13. Cerca de 5 μ l do produto de PCR foram submetidos à reação de RFLP, utilizando-se um painel de 16 diferentes endonucleases de restrição (*AvaI* (Gibco®), *AvaII* (Gibco®), *BamII* (Gibco®), *BamHI* (Gibco®), *EcoRV* (USB®), *EcoRI* (USB®), *HindIII* (Invitrogen®), *HaeIII* (Invitrogen®), *KpnI* (Invitrogen®), *MspI* (Invitrogen®), *PstI* (USB®), *ScaI* (USB®), *SmaI* (Invitrogen®), *SphI* (Gibco®), *SstI* (Sigma®) e *XmnI* (Sigma®). Em cada reação 1 U da enzima comercial foi adicionado juntamente com 2 μ l do respectivo tampão num volume final de 20 μ l. Os produtos foram digeridos por 3 horas à temperatura de 37°C e os diferentes perfis de restrição obtidos foram visualizados conforme descrito no item 3.4.13.

3.13 PCR *fingerprinting*

A amplificação do DNA genômico e de amostras direto da cultura foram realizadas em termociclador Eppendorf Mastercycler conforme descrito por Meyer et al. (1999). As reações foram preparadas em volume final de 20 μ l utilizando-se 2,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase (LabTrade®), 0,2 mM de cada dNTP, 10 pmol do iniciador M13 (5' GAGGGTGGCGGTTCT 3') e 10 ng/ μ l de DNA molde ou 3 μ l de cultura crescida conforme item 3.8, em tampão contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂. Para amplificação as amostras foram submetidas as seguintes condições: desnaturação a 94°C por

20 seg., seguido de 35 ciclos a 94°C por 20 seg., ligação do iniciador 50°C por 1 min., extensão a 72°C por 20 seg. e uma extensão final de 6 min. a 72°C. A visualização dos resultados foi realizada como descrito no item 3.15.

3.14 Amplificação de DNA das amostras através da técnica de RAPD

Para a amplificação do DNA genômico das amostras através da técnica de RAPD utilizou-se a metodologia descrita por Steindel et al. (1993). As reações foram preparadas num volume de 20 µl utilizando-se 1,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Labtrade®), 0,2 mM de cada dNTP, 10 pmol do iniciador (3303 5'- TCA CGA TGC A-3', 3304 5'- GCA CTG TCA- 3', 3306 5'-AGC ATC TGT T-3' e 3307 5'- AGT GCT ACG T-3') e 1ng/ µl de DNA molde em tampão contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8,5), 50 mM KCl e 1,5 mM MgCl₂. Para amplificação as amostras foram submetidas as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 min., 2 ciclos de ligação do iniciador a 30°C, 2 min. de extensão a 72°C, seguido de 33 ciclos a 94°C por 1 min., ligação do iniciador a 40°C por 1 min.e extensão a 72°C por 2 min. e uma extensão final de 5 min. a 72°C, a visualização dos resultados foi realizada conforme item 3.15.

3.15 Eletroforese de produtos de amplificação

Para visualização dos produtos de amplificação, 3 µl da amostra amplificada foi adicionada a 3 µl de tampão de amostra 2x (0,08% de azul de bromofenol, 0,08 de xileno

cianol e 10% de glicerol) e submetido à eletroforese em gel de agarose 1,4% a 120V por 3 horas ou em gel de poliacrilamida 5% a 100V por 2 horas. Os géis de agarose foram corados pelo brometo de etídio e as bandas visualizadas em transiluminador Macro Vue UV 20[®] (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco) e os géis de poliacrilamida foram corados pela prata. Em ambos os casos os géis foram documentados em sistema de fotodocumentação digital.

3.16 Purificação do produto amplificado do fragmento do gene CAP59.

Para purificação do produto de 597pb do fragmento do gene CAP59 amplificado conforme item 3.5, 15 µl do produto amplificado foram precipitados com 40 µl de isopropanol 70%, centrifugados a 13.000 x g / 45 min. e lavados com etanol 70%. A seguir, o DNA foi misturado a 13 µl de água ultrapura estéril e 3 µl da solução e foi submetido à eletroforese como o descrito no item 3.15.

3.17 Seqüenciamento do fragmento do gene CAP59

O seqüenciamento do produto de PCR realizou-se em um equipamento MegaBace 1000[®] (Amersham Biosciences, Piscataway[®]), utilizando um padrão de 100 ng a 200 ng de produto de amplificação. A reação de seqüenciamento foi preparada com o *kit DYEnamic[®] ET dye terminator* (Amersham Biosciences[®]) conforme especificações do fabricante. Após a reação de marcação, seguiu-se a purificação dos produtos utilizando-se isopropanol e etanol a 70% com o intuito de se retirar nucleotídeos e iniciadores não incorporados. Os produtos foram eletroinjetados a 2KV durante 120 segundos e eletroeluídos por 150 min. a 9KV.

3.18 Análise das seqüências obtidas

As seqüências do fragmento do gene CAP59 das amostras 41, 77 e padrão A (LMM 794) de *C. neoformans* foram alinhadas através do programa ClustalX[®] utilizando-se os parâmetros padrões. Após o alinhamento, os blocos de seqüências conservadas foram analisados através dos métodos de *bootstrap neighbour-joining* e máxima parcimônia (1000 réplicas) utilizando-se os programas MEGA v. 1.02[®] e PAUP 40b4a, respectivamente, para estimar a relação entre as cepas analisadas no presente estudo. O fenograma obtido foi construído com base nas seqüências do gene CAP59 depositadas no GenBank AB019367 (sorotipo A) ; AB019369 (sorotipo B); AB019370 (sorotipo C); L26508 (sorotipo D) e (AB019368 (sorotipo AD). Após a análise dos resultados, as três seqüências obtidas, das amostras (am-41, am77 e padrão A (LMM 794), no presente estudo foram depositadas no GenBank sob os seguintes números de acesso: DQ303429, DQ303430 e DQ303428 respectivamente.

4.0 RESULTADOS

4.1 Dados epidemiológicos

A análise dos prontuários dos 35 pacientes portadores de criptococose, atendidos no Hospital Nereu Ramos, mostrou que 34 deles (97,2%) eram portadores de HIV e um (2,8%)

era portador de diabetes do tipo II. Considerando-se a etnia, 80% eram brancos, 5,7% negros e 14,3% não foi possível determinar a etnia. Dos 35 pacientes, 66% eram do sexo masculino e 34% do sexo feminino, a faixa etária para mulheres foi de 23 a 72 anos e para homens foi de 24 a 64 anos, sendo a média de 36,5 anos para homens e de 40 anos para mulheres.

Em relação à procedência, 16 pacientes eram do município de Florianópolis, 13 dos municípios de Tijucas, São João Baptista, São Paulo, Herval D'Oeste, Porto Belo, Nova Trento, Chapecó, Criciúma, Campo Belo do Sul, São José, Capinzal, Imbituba, Tubarão e a procedência de 6 dos pacientes não pode ser determinada.

4.2 Extração de DNA

Os 12 protocolos testadas para a extração do DNA genômico de *C. neoformans*, duas (protocolos 4 e 11) delas foram totalmente ineficazes. Os demais 10 protocolos apresentaram resultados variáveis com relação à quantidade e a qualidade do DNA genômico extraído. Os melhores resultados foram obtidos com os protocolos 10 e 12, que mostraram um rendimento de 100 a 200 ng/μl e com grau de pureza 260/280 nm superior a 1,8. Sendo o protocolo 12 utilizado no processamento das amostras clínicas (Figura 2).

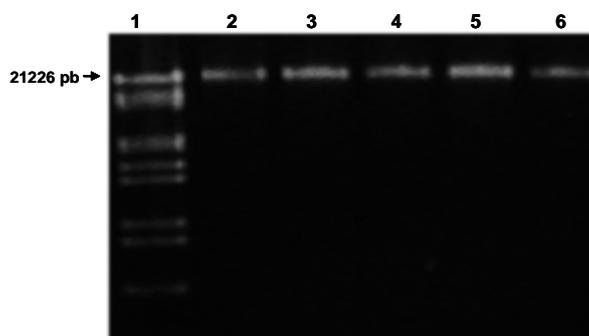


Figura-2. Análise da extração do protocolo 12, em gel de agarose 1,5% corado pelo brometo de etídio representativo da extração de DNA genômico das amostras de *Cryptococcus neoformans* utilizando o protocolo N° 12. 1- Vetor fago lambda clivado com *HindIII*[®]; 2 – controle positivo LMM794 DNA; 3- am.26; 4- am.39; 5- am.77; 6- am.45.

4.3 Padronização da reação de amplificação do gene CAP59 a partir de DNA genômico das amostras clínicas

A amplificação do DNA genômico de 35 amostras de *C. neoformans*, isoladas dos pacientes do Hospital Nereu Ramos e da cepa padrão LMM 794 (sorotipo A) com os iniciadores CAP59F e CAP59R, mostrou um produto de amplificação do tamanho esperado de 597 pb (Figura 3).

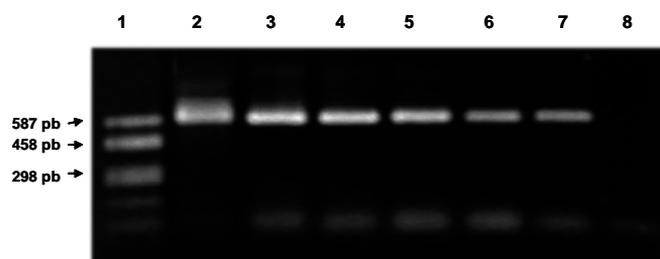


Figura-3. Gel em agarose 1,5% representativo dos produtos de amplificação do gene CAP59 dos isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* utilizando oligonucleotídeos CAP59F e CAP59R. 1- Vetor PUC18 clivado com endonuclease *HaeIII*[®]; 2- controle positivo LMM794 DNA; 3- am.39; 4- am.41; 5- am.42; 6- am.45; 7- am.48; 8- controle negativo (sem adição de DNA).

4.4. Determinação da especificidade da reação de amplificação do fragmento do gene CAP59 a partir de DNA genômico

O DNA de 4 diferentes espécies de fungos (*C. parapsilopsis*, *C. krusei*, *H. capsulatum* e *P. brasiliensis*) e da cepa padrão LMM 794 foi utilizado nos testes de especificidade dos iniciadores CAP59R e CAP59F utilizados na amplificação do fragmento do gene CAP59 (Figura 4). A cepa de *C. neoformans* apresentou uma banda única de 597 pb e de grande intensidade. As demais espécies testadas também apresentaram uma banda de aproximadamente 597pb, porém com intensidades diferentes, além de outros produtos de tamanhos distintos, mostrando a baixa especificidade destes iniciadores.

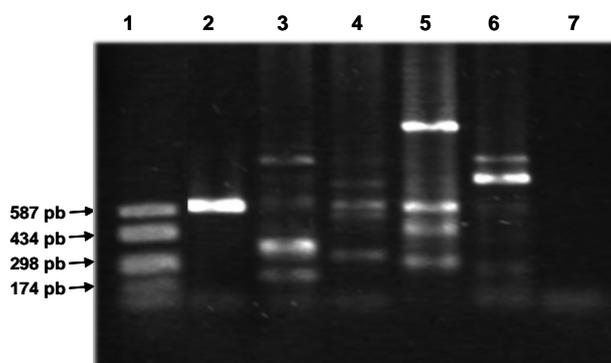


Figura-4. Gel em agarose 1,5% representativo da amplificação do fragmento do gene CAP59 de diferentes espécies fúngicas leveduriformes utilizando os iniciadores CAP59F e CAP59R. 1- Vetor PUC18 clivado com endonuclease HaeIII[®]; 2- *Cryptococcus neoformans* cepa padrão sorotipo A (LMM 794); 3- *Candida krusei*; 4- *Candida parapsilopsis*; 5- *Paracoccidioides brasiliensis*; 6, *Histoplasma capsulatum*; 7- controle negativo (sem adição de DNA).

4.5. Determinação da sensibilidade da reação de amplificação do fragmento do CAP59 a partir de DNA genômico

Através da metodologia descrita no item 3.5, foi possível detectar o fragmento do gene CAP59 via reação de PCR em uma concentração de até 2,4fg de DNA molde (Figura 5). A

sensibilidade dos iniciadores utilizados no presente estudo é maior do que os resultados obtidos em diferentes alvos gênicos para outras espécies de fungo (KAMBE et al., 2003).

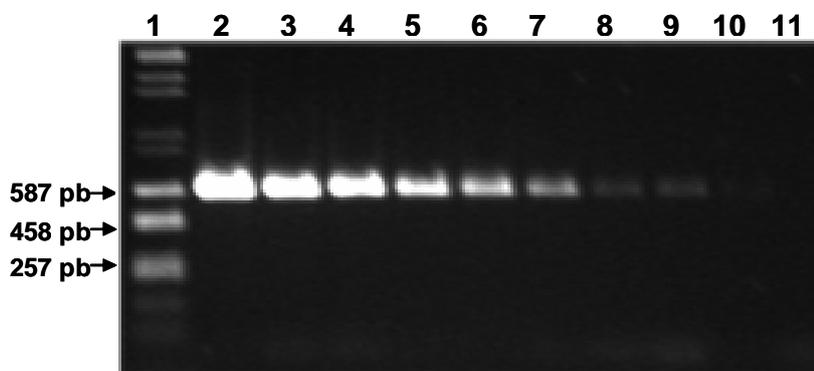


Figura-5. Gel em agarose 1,5% mostrando a sensibilidade dos iniciadores CAP59R e CAP59F na amplificação do fragmento do gene CAP59 frente a diferentes concentrações de DNA de *Cryptococcus neoformans*. 1- Vetor PUC18 clivado com endonuclease *HaeIII*[®] e fago lambda clivado com endonuclease *HindIII*[®], 2- 24ng; 3- 2,4ng; 4- 0,24ng; 5- 24pg; 6- 2,4pg; 7- 0,24pg; 8- 24fg; 9- 2,4fg; 10- 0,24fg; 11- controle negativo (sem adição de DNA).

4.6 Padronização da reação de amplificação do fragmento do gene CAP59 diretamente de amostras da cultura de isolados clínicos

Trinta e cinco amostras de *C. neoformans* isoladas dos pacientes foram submetidas à amplificação do gene CAP59 a partir de leveduras obtidas direto de cultura. Todas as 35 amostras de cultura apresentaram um produto de amplificação esperado de 597pb (Figura 6).

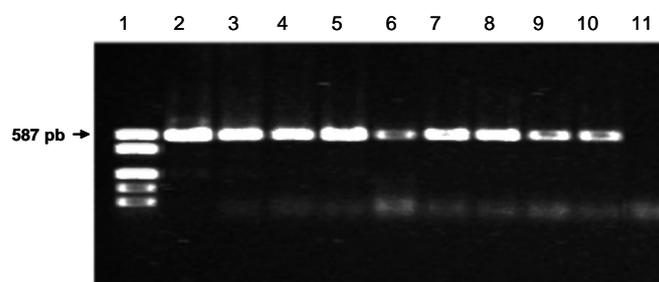


Figura-6. Gel em agarose 1,5% corado pelo brometo de etídeo, mostrando o produto amplificado do fragmento do gene CAP59 de isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* direto de cultura utilizando os iniciadores CAP59F e CAP59R. 1- Vetor PUC18 clivado com endonuclease *HaeIII*[®]; 2- controle positivo DNA da cepa LMM794; 3-am.256; 4- am.258; 5- am.77; 6- am.45; 7- am.48; 8- am.60; 9- am.169; 10- am.258; 11- controle negativo (sem adição de leveduras).

4.7. Determinação da sensibilidade dos iniciadores na amplificação do fragmento do gene CAP59 em amostras de *Cryptococcus neoformans* direto de cultura

Ao determinar a sensibilidade dos iniciadores na amplificação do fragmento do gene CAP59 direto de amostras de cultura, obteve-se a menor amplificação na amostra de cultura com D.O₆₀₀ de 0,13, que equivale a aproximadamente 1.000 leveduras por μl (Figura 7),.

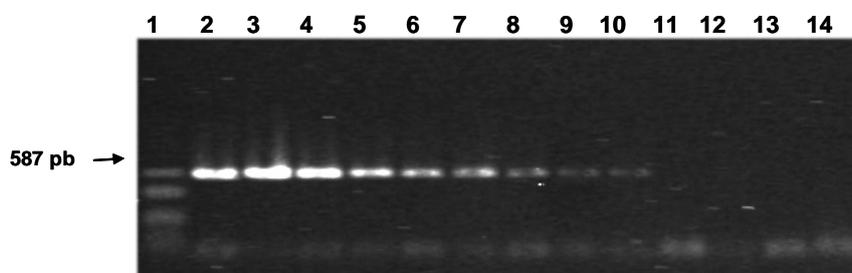


Figura-7. Gel em agarose 1,5% mostrando a sensibilidade dos iniciadores na amplificação do fragmento do gene CAP59 de *Cryptococcus neoformans* cepa padrão LMM 794 (sorotipo A) de amostra direto de cultura. 1 Vetor PUC18 clivado com endonulease HaeIII[®]; 2- controle positivo; 3- D.O₆₀₀ =17,0; 4- D.O₆₀₀ =8,5; 5- D.O₆₀₀ =4,26; 6- D.O₆₀₀ =2,13; 7- D.O₆₀₀ =1,06; 8- D.O₆₀₀ =0,53; 9- D.O₆₀₀ =0,26; 10- D.O₆₀₀ =0,13; 11- D.O₆₀₀ = 0,07; 12- D.O₆₀₀ =0,03; 13- D.O₆₀₀ =0,016; 14- controle negativo (sem adição de leveduras).

4.8 Amplificação do gene CAP59 diretamente de amostras clínicas de líquido

Dezesseis amostras clínicas de líquido positivo para *C. neoformans* foram submetidas à PCR para amplificação do gene CAP59, para comparação da sensibilidade entre a cultura e a microscopia. A amplificação do produto de 597 pb diretamente do líquido foi obtida em apenas 1/16 amostras testadas. A microscopia utilizando a coloração da tinta da China foi positiva em 100% (n= 16) e a cultura foi de 37,5% (n= 6) das amostras.

4.9 Avaliação da interferência da anfotericina B na amplificação do fragmento do CAP59 em amostras de cultura

Para determinar a possível interferência da presença de anfotericina na amplificação do fragmento do gene CAP59 nas amostras de líquido, a cultura da cepa LMM 794 de *C. neoformans* na presença de diferentes concentrações de anfotericina B foi utilizada diretamente na PCR. Os resultados mostraram que a presença de anfotericina B não interferiu na amplificação do produto de 597 pb (dados não mostrados), não alterando a sensibilidade da reação.

4.10 Determinação dos sorotipos de cepas de *C. neoformans* isoladas de amostras clínicas e ambientais no Estado do Rio Grande do Sul através da PCR-RFLP

Trinta e duas cepas de *C. neoformans* isoladas de amostras clínicas e ambientais no Rio Grande do Sul, anteriormente tipificadas pelo *kit* Crypto check[®], e pertencentes aos sorotipos A (HC1, HC2, HC4, HC5, HC6, HC7, A1, A2, A3, A4, A6, Az1, Az4, Az8, Az15, Az38 e A32045), B (AL6, AL10, AL11, AL12, AL32, AL33, AL34 e Az13), D (A42, A43, A45, A46, A48 e D28958) e AD (AD48184) e as amostras padrões do Rio de Janeiro sorotipos A (ATCC-LMM794), B (ATCC-LMM799), C (ATCC-LMM801), D (ATCC-LMM797) e AD (ATCC-LMM796) foram submetidos à amplificação do fragmento do gene CAP59 e o produto amplificado foi submetido à digestão com endonucleases conforme o proposto no item 3.12. Das 16 endonucleases de restrição testadas, 14 não produziram perfis de restrição do fragmento de 597 pb capazes de distinguir os diferentes sorotipos. Por outro lado, as enzimas A e B, protegida pelo processo de patente N° 23080.030228/2005-08, quando adicionadas juntas, produziram perfis de restrição distintos do fragmento de 597 pb

para os 5 sorotipos de *C. neoformans*, mostrando uma correlação de 100% da PCR-RFLP com a sorotipagem das amostras pelo *kit* comercial Crypto Check[®] (Iatron, Tokyo, Japan) (Figura 8).

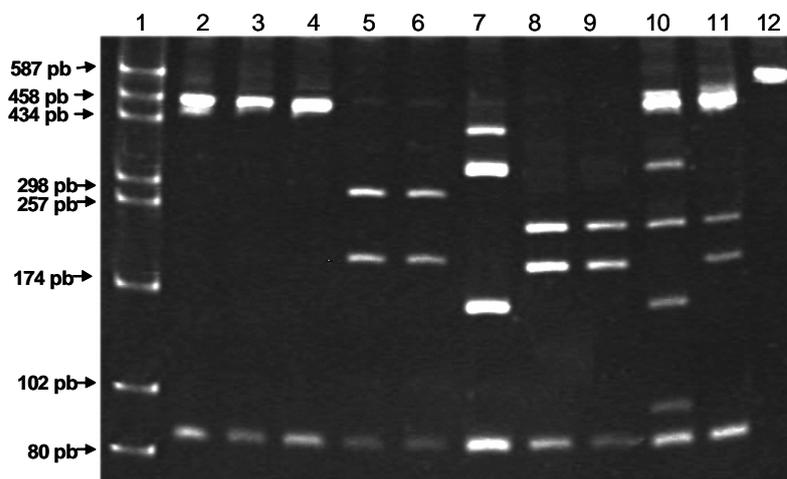


Figura-8. Gel em poliacrilamida 8% corado pelo brometo de etídeo representativo da digestão dupla pelas endonucleases A e B do fragmento de 597 pb do gene CAP59 do *Cryptococcus neoformans*. 1- Vetor PUC18 clivado com endonuclease *HaeIII*[®]; 2- amostra padrão sorotipo A (LMM794); 3- HC1 e 4- A6 (sorotipos A); 5- padrão sorotipo B (LMM799); 6- AL10 (sorotipo B), 7- padrão sorotipo C (LMM801); 8- padrão sorotipo D (LMM797); 9- A42 (sorotipo D); 10- padrão sorotipo AD (LMM796); 11- AD 48184 (sorotipo AD) e 12- Produto de PCR 597pb não digerido.

4.11 Determinação do perfil de restrição das amostras clínicas isoladas no Estado de Santa Catarina através da PCR-RFLP.

O DNA das 35 amostras de *C. neoformans* isoladas dos pacientes internados no Hospital Nereu Ramos em Santa Catarina foi submetido à tipificação através da técnica de PCR-RFLP conforme descrito no item 3.12, utilizando como padrões às amostras do Rio de Janeiro dos sorotipos: A (ATCC-LMM794), B (ATCC-LMM799), C (ATCC-LMM801), D (ATCC-LMM797) e AD (ATCC-LMM796). Os resultados mostraram que as 35 amostras de Santa Catarina pertencem ao sorotipo A, *C. neoformans* var. *grubii* (Figura 9).

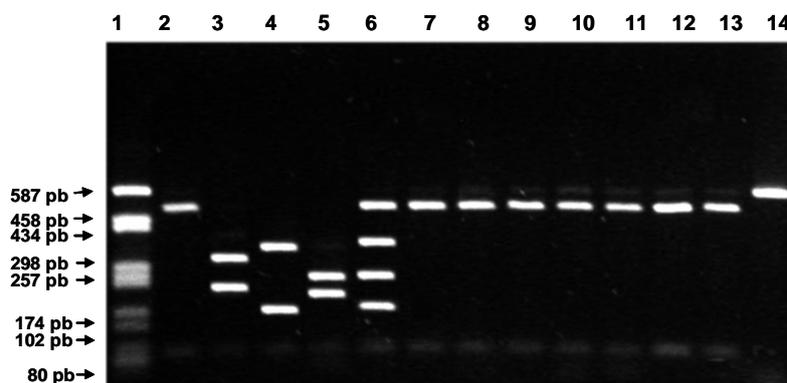


Figura-9. Gel em agarose 1,5% corado com brometo de etideo representativo da digestão dupla pelas endonucleases A e B do fragmento de 597 pb do gene CAP59 do *Cryptococcus neoformans*. 1- Vetor PUC18 clivado com endonuclese *HaeIII*[®]; 2- amostra padrão sorotipo A(LMM794); 3- padrão sorotipo B(LMM799); 4- padrão sorotipo C (LMM801); 5- padrão sorotipo D (LMM797); 6- padrão sorotipo AD (LMM796); 7- am.26; 8- am.39; 9- am.41; 10- am.45; 11- am.60; 12- am. 70; 13- am.77 e 14- Produto de PCR 597pb não digerido.

4.12 Determinação dos padrões moleculares através da técnica de PCR *fingerprinting*.

O iniciador M13 foi utilizado para amplificação de regiões repetitivas de minissatélites das amostras padrões do Rio de Janeiro e para as 35 amostras clínicas de *C. neoformans* isoladas dos pacientes internados no Hospital Nereu Ramos. Os tipos moleculares das amostras padrões de cada sorotipo A(LMM794), B(LMM799), C(LMM801), D(LMM797) e AD(LMM796) foram determinados utilizando-se amostras oriundas de Porto Alegre, anteriormente caracterizadas por Casali et al. (2003). Para as 35 amostras clínicas os tipos moleculares foram determinados utilizando as amostras padrões caracterizadas. A amplificação a partir de DNA purificado ou a partir de leveduras cultivadas mostrou resultados idênticos. Os padrões moleculares observados para as amostras padrões do Rio de Janeiro foram: sorotipo A, VNI; sorotipo B, VGI; sorotipo, C (não foi possível determinar o padrão molecular); sorotipo D, VNIV e sorotipo AD, VNIII (Figura 10). Das 35 amostras

clínicas de Santa Catarina, 34 amostras apresentaram perfil VNI, e uma amostra (77) apresentou perfil molecular distinto dos demais sorotipos (Figura 11).

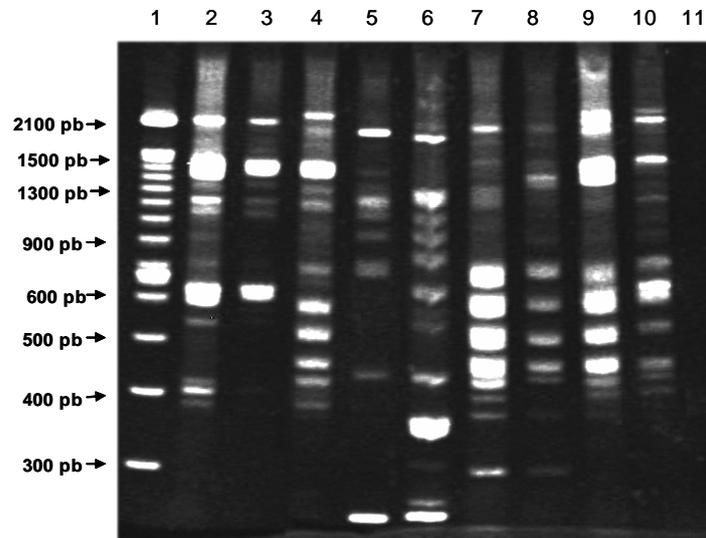


Figura-10. Gel poliacrilamida 5% corado pelo brometo de etídeo representativo do perfil de PCR-*fingerprinting* obtido com iniciador M13 das amostras padrões do Rio de Janeiro e amostras de Porto Alegre de *Cryptococcus neoformans*. 1- Marcador de tamanho molecular 100pb *ladder* (Invitrogen®) 2- padrão sorotipo A (LMM794); 3- HC1 (VNI); 4- padrão sorotipo B (LMM799), 5- AL10 (VGIII); 6- padrão sorotipo C (LMM801), 7- padrão sorotipo D (LMM797), 8- A42 (VNIV); 9- padrão sorotipo AD (LMM796); 10- 48184-AD (VNIII); 11- controle negativo (sem adição de DNA).

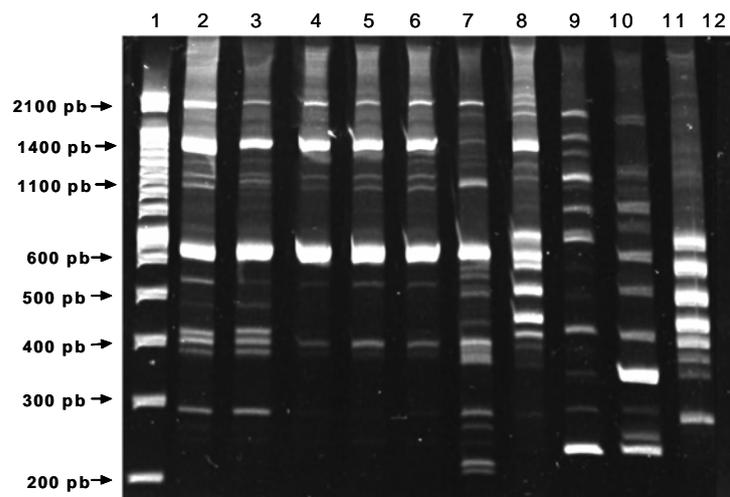


Figura-11. Gel poliacrilamida 5% corado pelo brometo de etídeo representativo do perfil de PCR-*fingerprinting* obtido com iniciador M13 de amostras clínicas de *Cryptococcus neoformans*. 1- Marcador de tamanho molecular 100pb *ladder* (Invitrogen®); 2- padrão sorotipo A (LMM794), VNI; 3- am.26; 4- am.39; 5- am. 41; 6- am. 45; 7- am.77; 8- padrão sorotipo AD (LMM796),VNIII; 9- padrão sorotipo B (LMM799), VGI; 10- padrão sorotipo C (LMM801), VGIV; 11- padrão sorotipo D (LMM797) (VNIV); 12- controle negativo (sem adição de DNA).

4.13 Avaliação da variabilidade genética de *Cryptococcus neoformans* através da técnica de RAPD.

Quatro iniciadores (3303, 3304, 3306 e 3307) foram utilizados na avaliação da variabilidade genética das 35 amostras clínicas *C. neoformans* isoladas em Santa Catarina em comparação com as amostras controles dos 5 sorotipos (A, B, C, D e AD). Cada iniciador mostrou um perfil distinto, cujo tamanho das bandas amplificadas variou de 100 a 2000 pb e o número de bandas variou de 10 para o iniciador 3303 a 15 para o iniciador 3304, sendo que a amplificação das amostras com os iniciadores 3306 e 3307 gerou um perfil muito pobre de bandas. As Figuras 12 e 13 apresentam o perfil de bandas obtido para as amostras clínicas dos diferentes sorotipos com os iniciadores 3303 e 3304, respectivamente. Das 35 amostras clínicas, 34 apresentaram um perfil muito homogêneo entre si e idêntico com a amostra padrão sorotipo A utilizando os iniciadores 3303 e 3304. A amostra 77 apresentou um perfil distinto dos 5 sorotipos avaliados.

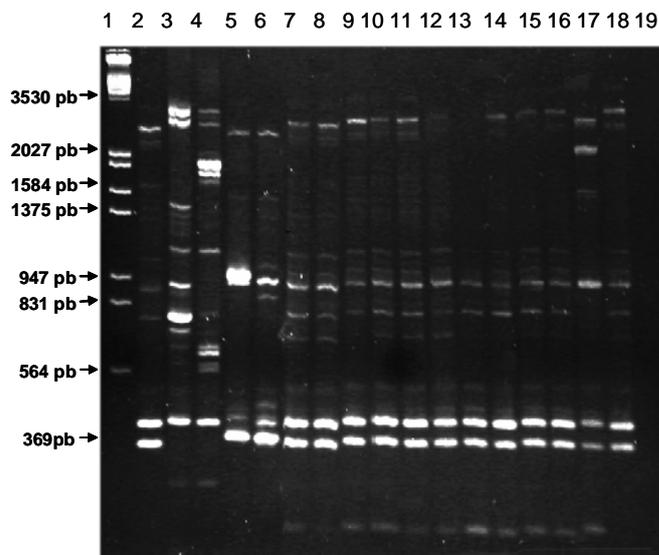


Figura-12. Gel em agarose 1,5% representativo da reação de RAPD com o iniciador 3303 obtido de amostras clínicas de *Cryptococcus neoformans*. Linha:1 Marcador de tamanho molecular Vetor fago lambda clivado com endonuclease *HindIII*[®]; 2, padrão sorotipo A (LMM794); 3, padrão sorotipo B (LMM799); 4, padrão sorotipo C (LMM801); 5, padrão sorotipo D (LMM797); 6, padrão sorotipo AD (LMM796); 7- am.26; 8- am. 39; 9- am.41; 10- am. 45; 11- am. 48; 12- am. 60; 13- am.70; 14- am.71; 15- am. 76; 16- am.137; 17 am. 77; 18- am. 236; 19- controle negativo (sem adição de DNA).

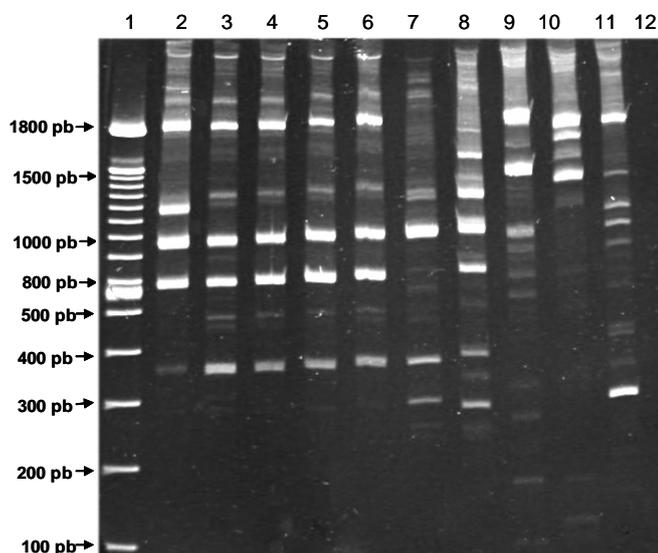


Figura-13. Gel de poliacrilamida 5% representativo da reação de RAPD com o iniciador 3304 obtido de amostras clínicas de *Cryptococcus neoformans* Linha:1- Marcador de tamanho molecular de 100pb *ladder* (Invitrogen®); 2- padrão sorotipo A (LMM794); 3- am. 26; 4- am.39; 5- am.41; 6- am.45; 7- am. 77; 8- padrão sorotipo AD (LMM796),HU17990; 9- padrão sorotipo B (LMM799); 10- padrão sorotipo C (LMM801); 11- padrão sorotipo D (LMM797); 12- controle negativo (sem adição de DNA).

4.14 Seqüenciamento e análise do fragmento do gene CAP59

O seqüenciamento do fragmento de 597pb, que possui 30% da seqüência codificante do exon de maior tamanho do gene CAP59 das amostras isoladas de Santa Catarina (41 e 77) e amostra padrão A (ATCC LMM794) resultou em uma média de fragmentos de 530pb. Foram realizados alinhamentos múltiplos com os fragmentos seqüenciados e suas respectivas seqüências de aminoácidos previstas utilizando o programa ClustalX, e essas seqüências serviram como base para a construção de árvores filogenéticas. Utilizando os métodos de *neighbour-joining* e máxima parcimônia (ambos com 1000 réplicas) utilizando os programas

MEGA v. 3.2[®] e PAUP 40b4a, as árvores geradas por ambos os métodos, apresentaram a mesma estrutura e topologia. Assim sendo, no presente estudo serão demonstradas somente as análises filogenéticas geradas por *neighbour-joining* e distância *p* (*bootstrap* 1000), sendo todos os valores $p < 0,15$.

As análises comparativas entre as seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos do fragmento CAP59 das amostras isoladas de Santa Catarina (41 e 77) e a amostra padrão A (ATCC LMM794), utilizando o programa BL2seq (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) revelou que a similaridade entre estas e em relação às seqüências das amostras de sorotipo A (AB019367) e AD (AB019368), depositadas no Genbank foi maior que 97%. No entanto, realizando-se a análise com seqüências dos sorotipos B (AB019369) e C (AB019370) a similaridade decaiu para 88%. Entretanto, na análise com seqüências de nucleotídeos e aminoácidos do sorotipo D (L26508), observou-se 93% de similaridade entre as mesmas.

As análises filogenéticas revelaram que as seqüências nucleotídicas do fragmento do gene CAP59 das amostras 41, 77 e a amostra ATCC LMM794 (A) agruparam com sorotipo A (AB019367) e com o híbrido AD (AB019368) (Figura 14). As análises filogenéticas das seqüências preditas de aminoácidos do fragmento do gene CAP59 apresentaram uma topologia um pouco distinta daquela apresentada pelas análises nucleotídica, agrupando as seqüências padrões do sorotipo A (AB019367) e AD (AB019368) em um ramo distinto das amostras 41, 77 e ATCC LMM794 (Figura15).

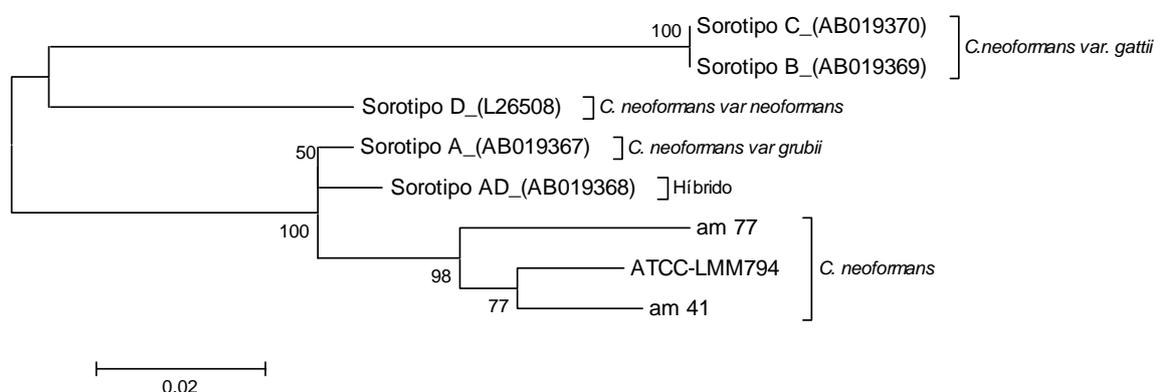


Figura-14. Árvore filogenética geradas através da análise de seqüências de nucleotídeo do fragmento do gene CAP59, pelo método *neighbour-joining* e distância *p* (bootstrap 1000) do fragmento do gene CAP59 das cepas de *C. neoformans* isolados de diferentes amostras clínicas. Programa MEGA v. 1.02.[®]

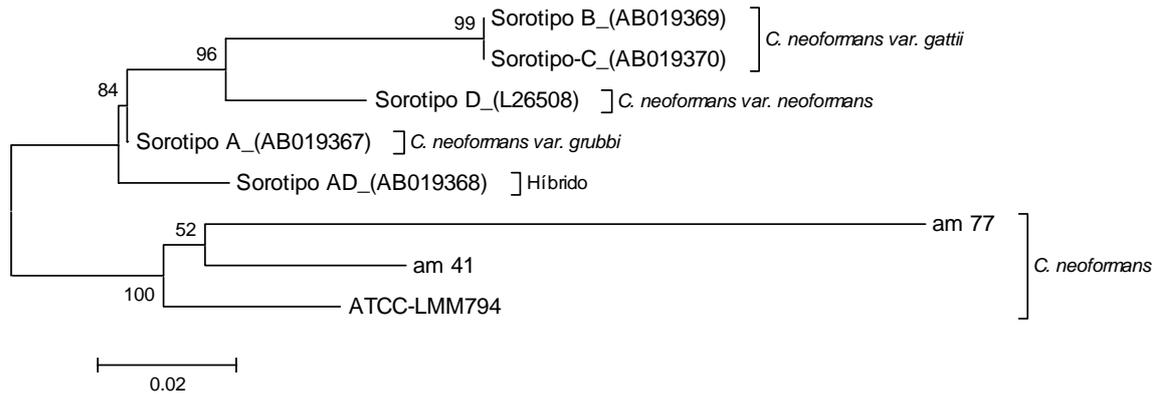


Figura-15. Árvore filogenética geradas através da análise de seqüências preditas de aminoácidos do fragmento do gene CAP59 pelo método *neighbour-joining* e distância *p* (bootstrap 1000) das seqüências de aminoácidos preditas do fragmento do gene CAP59 das cepas de *C. neoformans* isolados de diferentes amostras clínicas. Programa MEGA v. 1.02.[®]

5.0 DISCUSSÃO

Os grandes avanços na área da saúde têm proporcionado um aumento da expectativa de vida, porém, tem ocorrido um aumento na incidência de infecções por microorganismos oportunistas anteriormente raras. Dessa forma, é de grande valia o melhor conhecimento da ecologia e da epidemiologia desses microorganismos (CASADEVALL; PERFECT, 1998).

Nesse contexto, a importância do fungo *C. neoformans* decorre do fato desse microrganismo zoopatogênico cosmopolita ser o responsável pela criptococose em humanos, principalmente em pacientes imunocomprometidos (NISHIKAWA, et al., 2003). O presente estudo visou à caracterização molecular de isolados clínicos de *C. neoformans* obtidos de pacientes do Estado de Santa Catarina, bem como propõe uma nova metodologia para a tipagem molecular dos sorotipos deste fungo.

A extração do DNA genômico de *C. neoformans* apresentou-se bastante laboriosa, somente duas dos 12 protocolos testados e publicados na literatura (VARMA ; KWON-CHUNG, 1991; FUJIMURA; SAKAMURA, 1993; DEL POETA et al., 1999; BIALEK et al., 2000; NAKAMURA, et al., 2000; BOLANO et al., 2001; CASALI et al., 2003; DRIVINYA; SHIMIZU; TAKEO, 2004; TOFFALETTI et al., 2004; KATSU et al., 2004;), somente dois (protocolos 10 e 12) mostraram um rendimento quali-quantitativamente satisfatório, possibilitando a obtenção de concentrações de DNA de 100 a 200ng/ul e com grau de pureza 260/280 nm superior a 1,8. Além disso, a comparação da extração de DNA de amostras mantidas por longos períodos em cultura (cápsula reduzida) e amostras de pacientes recém

isoladas (cápsula abundante) mostrou que nas amostras recentemente isoladas a quantidade de DNA obtido foi cerca de 10 a 20 vezes menor (dados não mostrados). Logo a extração de DNA das amostras padrão resultou em melhor rentabilidade considerando a quantidade e a qualidade do DNA quando comparada com as amostras clínicas recém isoladas. Dois protocolos (4 e 11) descritos na literatura, foram totalmente ineficazes para o isolamento de DNA das amostras padrão de *C. neoformans*. Os oito protocolos mostraram resultados muito variáveis, proporcionando concentrações de DNA inferiores a 10ng/ul e com grau de pureza 260/280 nm inferior a 1,8.

Estas grandes diferenças na obtenção de DNA parecem resultar em grande parte, das diferenças na espessura da cápsula do fungo. Estudos anteriores mostraram que amostras de *C. neoformans* mantidas em cultivo contínuo sofrem uma redução significativa na espessura da cápsula, tornando-a cerca de 2 a 3 vezes menos espessa que nas amostras recém isoladas (GRANGER; PERFECT; DURACK, 1985; VARTIVARIAN et al.,1993). Esta diferença na espessura da cápsula parece estar relacionada com os mecanismos de defesa do fungo frente ao sistema imune do hospedeiro (FELDMESSER et al., 2001; ZARAGOZA; CASADEVALL, 2004; D'SOUZA et al., 2004).

Os ensaios de extração de DNA realizados no presente estudo mostraram que amostras de *C. neoformans* recentemente isoladas em cultura mostraram-se mais resistentes aos agentes químicos, físicos e às enzimas responsáveis pela lise celular. Observações microscópicas destas amostras na presença de tinta da China evidenciaram a presença de uma espessa cápsula que em geral, é cerca de 3 a 4 vezes o tamanho da levedura (dados não mostrados). Fato este que vem ao encontro com o estudo desenvolvido por D'Souza et al. (2004), que mostraram que após a infecção do hospedeiro por esta levedura há um aumento capsular bastante expressivo. Estudos anteriores mostraram que a resistência à lise celular frente às enzimas oxidativas produzidas dentro das vesículas dos macrófagos é um fenômeno bastante

marcante em *C. neoformans* e que esta característica está relacionada à espessura e à composição da cápsula polissacarídica (FELDMESSER et al., 2001).

Durante os ensaios de extração de DNA foram realizadas algumas observações que corroboraram os dados da literatura e mostraram a grande resistência da levedura aos agentes químicos e físicos. Quando as amostras de *C. neoformans* obtidas de isolados clínicos recentes foram submetidas à extração de DNA pelo protocolo padrão fenol/clorofórmio (v/v) e o precipitado celular restante foi semeado em meio de cultura CG a 37°C por 24 horas observou-se um intenso crescimento das leveduras. Da mesma forma, quando leveduras submetidas a choques térmicos com temperaturas variando de -196°C a +100°C, seguidos de extração em fenol/clorofórmio observou-se na microscopia óptica que as leveduras mostraram-se íntegra e quando semeadas em meio CG apresentaram crescimento. Esses resultados estão de acordo com a literatura que mostra que a presença da cápsula polissacarídica é um importante mecanismo de proteção contra agentes físicos e químicos presentes no meio ambiente (STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001).

O gene CAP59 possui 5 exons e é um dos 30 genes envolvidos na produção de cápsula do fungo *C. neoformans* (LOFTUS, et al., 2005). Iniciadores (CAP59R e CAP59F) desenhados a partir da seqüência do gene CAP59, permitem a amplificação de um fragmento de 597 pb, o qual contém 30% da seqüência codificante do exon mais longo deste gene (NAKAMURA et al., 2000). No presente trabalho utilizou-se este par de iniciadores para testar sua especificidade e sensibilidade na amplificação do fragmento do gene, tanto em amostras de DNA purificado, como em leveduras obtidas diretamente de cultura e de amostras de líquido.

A especificidade da reação de amplificação foi testada com intuito de avaliar a possibilidade de se desenvolver um diagnóstico específico entre a espécie de *C. neoformans* e outras espécies de fungo leveduriformes causadores de doença humana. Para tanto,

utilizaram-se amostras de DNA extraído de *C. neoformans* e de outras espécies de leveduras (*C. parapsiloris*, *C. krusei*, *H. capsulatum* e *P. brasiliensis*), tendo sido observada a presença de uma banda de 597pb de intensidade forte em *C. neoformans* e de intensidade variável em todas as amostras de leveduras testadas. Além disso, todas as amostras, à exceção de *C. neoformans*, apresentaram um padrão complexo de bandas de tamanhos moleculares distintos. Este resultado mostra que os iniciadores CAP59R e CAP59F não são espécie-específicos, impossibilitando a distinção de uma co-infecção, numa amostra clínica. Entretanto, quando a amplificação foi feita com amostras diretamente de cultura (sem extração prévia de DNA), os resultados mostraram a presença da banda de 597 pb apenas em *C. neoformans*.

Com intuito de testar a sensibilidade dos iniciadores CAP59R e CAP59F foram realizados experimentos de reconstituição de DNA em diferentes concentrações. Os resultados do presente estudo mostraram que a detecção de DNA genômico de *C. neoformans* foi de 2,4 fg em gel de agarose. Kanbe et al. (2003), estudando algumas espécies de *Cândida spp* e *Aspergillus fumigatus*, demonstraram que a sensibilidade dos iniciadores dirigidos contra o gene da topoisomerase II foi acima de 1pg de DNA. Desta forma, os resultados obtidos no presente estudo mostram que a sensibilidade dos iniciadores CAP59F e CAP59R foi maior do que comparado com os dados descritos na literatura para detecção de DNA de fungos.

Tendo em vista a dificuldade de extração de DNA genômico do fungo, realizaram-se ensaios de amplificação do fragmento do gene CAP59 de amostras direto da cultura. Para tanto, uma amostra de cultura de *C. neoformans* com D.O₆₀₀ de 17 foi diluída em série até atingir uma D.O₆₀₀ de 0,032 e 3 µL da amostra foram utilizados na amplificação do fragmento de 597pb. A intensidade do produto de amplificação de 597 pb foi concentração dependente e a presença da banda esperada foi observada em gel de agarose 1,5%, até a D.O₆₀₀ 0,13, o que equivale aproximadamente a 1000 leveduras por µl. Estes resultados mostram que a sensibilidade dos iniciadores CAP59F e CAP59R, quando usado diretamente

em amostras de cultura foi baixa. Extrapolando-se esses resultados para amostras clínicas, há a necessidade de se ter uma média de 10^6 leveduras por ml de líquido.

Ensaio de detecção para *C. neoformans* diretamente em amostras clínicas, comparando a técnica de coloração de tinta da China, o isolamento em cultura com meio CG e a PCR do fragmento do gene CAP59 direto de cultura, foram realizados com 16 amostras de líquido. A PCR foi positiva em apenas 6,25% contra 37,5% da cultura e 100% na tinta China. Estes resultados mostraram que iniciadores não são adequados para detecção do fungo diretamente em espécimes clínicos.

No sentido de investigar uma provável inibição da reação da PCR devido ao aumento da concentração de proteína no líquido, quando há infecção por esse fungo e pela presença de anfotericina B, após o início do tratamento (BICANIC; HARRISON, 2005), foram realizados experimentos de reconstituição de líquido negativo com 10 ng de DNA genômico purificado e/ou de 10^7 leveduras/ml. Os resultados mostraram a amplificação da banda de 597 pb nos dois testes (dados não mostrados), indicando a ausência de interferência da composição do líquido e comprovando a baixa sensibilidade dos iniciadores para a detecção de leveduras numa concentração inferior a 10^6 leveduras por ml de líquido. Da mesma forma, a presença de anfotericina B não impediu a amplificação do fragmento de 597 pb diretamente em amostras de líquido semeadas com 10^6 leveduras e tratado com diferentes concentrações do antibiótico, mostrando que a ausência de amplificação nas amostras de líquido de pacientes com criptococose não se deve ao tratamento medicamentoso, mas, provavelmente, ao fato da quantidade de leveduras presentes na amostra clínica de líquido ser inferior a 1000 organismos por μL .

Estudo desenvolvido por Okabayashi et al. (2003), utilizando os iniciadores CAP59R e CAP59F na detecção de *C. neoformans* em amostras clínicas obtidas de dois gatos com criptococose, mostrou serem esses iniciadores capazes de amplificar o fragmento do gene em

amostras de urina, soro e biópsia submetido à extração de DNA, sugerindo a PCR como um método sensível e rápido para o diagnóstico da criptococose em animais. No entanto, os resultados obtidos no presente trabalho, mostram que os iniciadores (CAP59R e CAP59F) apresentam baixa sensibilidade para amplificar o fragmento do gene em amostra clínica direto do líquido dos pacientes estudados.

A sorotipagem baseada em anti-soro produzido contra diferentes epítomos do polissacarídeo que compõe a cápsula desta levedura (IKEDA et al., 1982), desenvolvido na década de 80, permitiu a classificação de *C. neoformans* em cinco sorotipos (A, B, C, D e AD). Estudos envolvendo dados epidemiológicos, ecológicos, fisiológicos e genéticos subdividiram, na década de 90, a espécie *C. neoformans* em três variedades (*grubii*, *neoformans* e *gattii*) permitindo, assim, avanços significativos no conhecimento deste patógeno (FRANZOT et al., 1999; MEYER et al., 2003, KATSU et al., 2004; D'SOUZA et al., 2004). O kit de tipificação (Cripto Check[®]) produzido pela empresa Iatron no Japão, que utiliza anticorpos monoclonais contra a cápsula polissacarídica apresenta um custo de 14 dólares americanos por amostra e recentemente teve sua produção interrompida.

No presente estudo, utilizou-se um painel de enzimas de restrição para clivar o fragmento amplificado de 597 pb do gene CAP59 de *C. neoformans*. Os resultados obtidos mostraram que a digestão combinada de duas endonucleases A e B gerou um perfil de restrição próprio para cada um dos diferentes sorotipos de *C. neoformans* das cinco amostras padrão provenientes do Laboratório de Micologia Médica da FIOCRUZ. Dessa forma, a metodologia de PCR-RFLP desenvolvida e protegida pelo processo de patente N° 23080.030228/2005-08, foi utilizada na tipificação de 32 amostras de *C. neoformans* previamente tipificadas pelo kit Cripto Check[®] (CASALI et al., 2003) cedidas pelo Laboratório de Micologia do Centro de Biotecnologia da UFRGS e 35 amostras isoladas de pacientes do Estado de Santa Catarina.

Os resultados mostraram uma correlação de 100% entre os perfis de PCR-RFLP e os sorotipos determinados pelo kit Cripto Check[®] nas amostras provenientes do Rio Grande do Sul. Duas amostras padrão do sorotipo AD (LMM796 do Rio de Janeiro) e a amostra (ATCC48184-AD), do Rio Grande do Sul, apresentaram um perfil de restrição distinto entre elas (Figura 8). A amostra LMM796 apresentou um perfil combinado de AD com duas bandas observadas no padrão sorotipo C. Este resultado pode ser devido aos múltiplos eventos de hibridização entre as cepas dos sorotipos A (*C. neoformans* var. *grubii*) e D (*C. neoformans* var. *neoformans*), os quais são responsáveis pela corrente distribuição das cepas do sorotipo AD (XU et al. 2003).

Com base nesses resultados, pode-se afirmar que a PCR-RFLP é uma técnica sensível, específica, reprodutível e de baixo custo (cerca de US\$ 2.00/amostra), que permite a caracterização inequívoca de amostras de *C. neoformans* a partir de amostras clínicas isoladas em cultura. Essa metodologia pode ainda ser de grande utilidade no acompanhamento das reinfecções ou das recrudescências que acontecem nos pacientes imunossuprimidos.

As 35 amostras isoladas de pacientes do Estado de Santa Catarina apresentaram um perfil homogêneo e igual ao da amostra padrão (LMM794), sorotipo A de *C. neoformans* var. *grubii*. Estes resultados estão de acordo com dados da literatura que mostram que *C. neoformans* var. *grubii* é a variedade predominante em pacientes imunodeficientes (principalmente em pacientes com AIDS) tanto no Brasil (CASALI et al., 2003; NISHIKAWA, et al., 2003; BARRETO DE OLIVEIRA et al., 2004) como em outras regiões do mundo (MITCHEL, PERFECT, 1995; STEENBERGEN, CASADEVAL, 2000; OHKUSU et al., 2002; MEYER et al., 2003).

Diferentes marcadores moleculares podem ser utilizados no estudo da variabilidade genética de organismos. Meyer et al. (2003), utilizaram a técnica de PCR-*fingerprinting* com o iniciador M13 dirigido para regiões repetitivas de DNA (micro e minisatélites) e elaboraram

um banco de dados para caracterizar amostras de *C. neoformans* de todas as regiões ibero-americanas. Das 277 amostras clínicas, veterinárias e ambientais analisadas, 57 amostras (56 clínicas e 1 veterinária) foram provenientes do Brasil e oriundas dos estados de São Paulo, Piauí e Rio Grande do Sul. As 39 amostras provenientes de pacientes com AIDS do Estado de São Paulo mostraram uma predominância do padrão molecular VNI (n=36), seguido de VGII (n=2), VNII (n=1). Das seis amostras oriundas do Estado do Piauí, apenas uma amostra teve sua procedência de paciente HIV positivo que mostrou um padrão molecular VGII. As outras cinco amostras foram caracterizadas como VNI (n=3) e VGII (n=2). Da mesma forma, nos estudos desenvolvidos por Casali et al. (2003), no Estado do Rio Grande do Sul, das 124 amostras clínicas de *C. neoformans*, 83,8% apresentaram padrão molecular VNI (var. *grubii*), 8,87% VGIII (var. *gatti*) e 7,26% VNIV(var. *neoformans*). Esses resultados mostraram que no Brasil ocorrem sete padrões moleculares (VNI, VNII) var. *grubii* , (VNIII) híbrido AD, (VNIV) var. *neoformans* e (VGI, VGII e VGIII) var. *gatti* de *C. neoformans*.

No presente estudo, também foi utilizada a metodologia de PCR*fingerprinting* conforme descrito por Meyer et al. (1999) para investigar os padrões moleculares dos isolados clínicos de *C. neoformans* isolados de pacientes do Estado de Santa Catarina e a tipagem das amostras padrão do Rio de Janeiro. Para tanto, as amostras HC1 (VNI), AL10 (VGIII), A42 (VNIV) e AD48184 (VNIII) de *C. neoformans* do Rio Grande do Sul, que haviam sido previamente caracterizadas por essa metodologia foram utilizadas como padrões. A amostra padrão (LMM794), do Rio de Janeiro, sorotipo A apresentou o perfil molecular da amostra HC1, padrão molecular VNI. Já a amostra (LMM799) sorotipo B foi distinta das amostras de AL10 padrão molecular (VGIII) (sorotipo B) do Rio Grande do Sul. Entretanto, comparando-se os perfis moleculares publicados por Casali et al. (2003) e Meyer et al. (2003), o padrão molecular da amostra padrão sorotipo B do Rio de Janeiro é muito semelhante ao padrão VGI. A amostra padrão (LMM801) sorotipo C apresentou um padrão molecular semelhante ao

VGIV descrito por Casali et al. (2003) e Meyer et al. (2003). A amostra padrão (LMM797) sorotipo D, apresentou um perfil molecular idêntico à amostra A42 padrão molecular (VNIV) e a amostra padrão (LMM796) sorotipo AD mostrou um perfil gênico idêntico a amostras AD48184 com padrão molecular (VNIII). Em 34 (97,5%) das amostras de Santa Catarina o padrão molecular observado foi o VNI (var. *grubii*) e uma amostra (amostra 77) apresentou padrão distinto de todos os perfis moleculares.

Análise dos perfis em gel de poliacrilamida mostrou uma variabilidade intra-específica das amostras pela presença ou ausência de produtos de amplificação de 310 e 320 pb em alguns isolados. Estes resultados estão de acordo com a literatura que mostra que o padrão VNI é o mais freqüente entre os isolados de *C. neoformans* de pacientes com AIDS, tanto no Brasil como em outras partes do mundo (MEYER et al., 1999; 2003; COGLIATI et al., 2000; ELLIS et al., 2000).

A amostra 77 apresentou um perfil molecular semelhante ao padrão VNIII* descrito para a amostra LA14#, sorotipo AD, isolada em 1997 de um paciente com AIDS na Cidade do México (MEYER et al., 2003). Entretanto, a sorotipagem da amostra 77 utilizando *kit* comercial Crypto Check[®] realizada pelo Laboratório de Micologia do Centro de Biotecnologia da UFRGS revelou que esta amostra pertence ao sorotipo A, *C. neoformans* var *grubii* (resultados não mostrados). Em virtude de não dispor da amostra (VNIII*) como referência entre os isolados estudados, não foi possível determinar com segurança o padrão molecular da amostra 77.

A variabilidade genética de *C. neoformans* tem sido abordada através de diferentes metodologias (PCR-*fingerprinting*, RFLP, RAPD e sequenciamento genômico) por diferentes autores (ELLIS; PFEIFFER, 1990; MEYER et al., 1999; NAKAMURA et al., 2000; MEYER et al., 2003; CASALI et al., 2003; KATSU et al., 2004; LOFTUS et al., 2005). No presente estudo, a variabilidade genética das amostras de *C. neoformans* do Estado de Santa Catarina,

juntamente com as amostras padrão, foi avaliada através da técnica de RAPD utilizando iniciadores (3303, 3304, 3306 e 3307). Os iniciadores 3306 e 3307 geraram perfis pobres em bandas em todas as amostras, com exceção dos padrões LMM799 (sorotipo B) e LMM797 (sorotipo D) que não apresentaram amplificação em nenhuma das três tentativas realizadas com esses iniciadores. Por outro lado, os iniciadores 3303 e 3304 geraram perfis mais complexos. Trinta e quatro amostras do Estado de Santa Catarina apresentaram um perfil idêntico ao da amostra padrão sorotipo A (LMM794) e uma (amostra 77) apresentou genótipo distinto das 5 amostras padrão utilizadas para os dois iniciadores.

Varma et al. (1995), analisando 156 cepas de *C. neoformans* pela técnica de RAPD, concluíram que o *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii* podem ser classificados em vários grupos de acordo com seu distinto perfil molecular. Aoki et al. (1999), estudando outros iniciadores para identificar os diferentes sorotipos de *C. neoformans* do Estado de São Paulo através da RAPD, agruparam as 33 amostras dos sorotipos A e B em dois grupos diferentes utilizando o iniciador R1. Utilizando o iniciador R2 esses mesmos autores obtiveram perfis moleculares distintos para os 5 sorotipos conhecidos desse fungo. Ruma et al. (1996) relataram a capacidade da técnica de RAPD em distinguir entre os sorotipos A, D, ou AD de *C. neoformans* e que é possível separar os sorotipos B e C de *C. neoformans* var. *gattii*. Katsu et al. (2004), estudando a variabilidade genética de 96 isolados de *C. neoformans* var. *gattii* através da técnica de RAPD, mostraram que os sorotipos B e C foram agrupados em três subtipos moleculares. No presente estudo, através da técnica de RAPD, utilizando os dois iniciadores (3303 e 3304), também se pôde indicar a discriminação dos 5 sorotipos (A, B, C, D e AD) das amostras padrão do Rio de Janeiro, bem como agrupar as 35 amostras de *C. neoformans* var. *grubii* em dois diferentes grupos.

As diferenças no perfil da amostra 77 frente à PCR-RFLP, PCR-*fingerprinting* e nos resultados de RAPD, sugerem tratar-se de uma amostra híbrida (A e D). A hibridização entre

os sorotipos A e D de *C. neoformans* foi observada por Xu et al. (2003) em diferentes estudos experimentais. No presente estudo, a amostra 77 (sorotipo A pelo kit Crypto Check[®]) e pela técnica da PCR-RFLP, apresentou perfil distinto na PCR-*fingerprinting* e no RAPD. Resultados semelhantes foram relatados por Meyer et al. (2003) no estudo de 102 amostras Ibero-americanas de *C. neoformans* sorotipificadas pelo Crypto Check[®] como sorotipo A, onde pelo método da PCR-*fingerprinting*, 99 dessas amostras foram tipificadas como VNI (A) e 3 como VNIII (AD).

Com o intuito de avaliar as diferenças intra-específicas de algumas amostras clínicas estudadas no âmbito do presente estudo, foi realizado o seqüenciamento do produto de amplificação do fragmento do gene CAP59 das amostras 41, 77 e amostra padrão A (LMM794), as quais apresentaram uma similaridade de 96%, tanto na seqüência de nucleotídeos, como na seqüência predita de aminoácidos. Utilizando-se seqüências do gene CAP59 dos sorotipos A (AB019367), B (AB019369), C (AB019370), D (L26508) e AD (AB019368) disponíveis no GenBank, na comparação das amostras através dos programas MEGA v. 3.2[®] e PAUP 40b4a, utilizando os métodos de *neighbour-joining* e máxima parcimônia (ambos com 1000 réplicas), a árvore filogenética foi construída baseada nas seqüências nucleotídicas, contendo duas réplicas, das amostras 41, 77 e LMM792. Estas amostras foram incluídas no mesmo grupo das seqüências nucleotídicas referenciais dos sorotipos A (AB019367) e AD (AB019368) obtidas no GenBank (Figura 14), demonstrando, dessa forma, um elevado grau de similaridade nos nucleotídeos do fragmento do gene CAP59. Já em relação às seqüências preditas de aminoácidos, a análise não agrupou as amostras 41, 77 e LMM792 com seqüências referenciais de aminoácidos dos sorotipos A (AB019367) e AD (AB019368) (Figura 15), mas sim com as seqüências de aminoácidos dos sorotipos B (AB019369), C (AB019370) e D (L26508) obtidas do GenBank, revelando um baixo *score* e, por conseguinte, a fragilidade da análise. As seqüências das amostras 41, 77 e LMM794

apresentaram uma baixa similaridade quando comparadas com as seqüências de nucleotídios e de aminoácidos dos sorotipos B, C e D depositadas no GenBank explicando, assim, os diferentes agrupamentos observados nas árvores filogenéticas de seqüências nucleotídicas e de aminoácidos preditos.

Análises epidemiológicas das amostras isoladas no HNR no Estado de Santa Catarina revelaram que dos 35 pacientes analisados, 34 eram portadores do HIV e um era portador de diabetes mellitus. Estes dados corroboram dados da literatura que mostram ser o *C. neoformans* var. *grubii* a espécie mais freqüente nas infecções de pacientes imunocomprometidos (ELLIS et al., 2000). A maior freqüência da infecção em pacientes caucasianos pode ser decorrente de viés de amostragem, uma vez que não existem dados na literatura demonstrando correlação entre a susceptibilidade à infecção por *C. neoformans* na e a etnia. A maior freqüência de criptococose em homens 66% (n= 23) do que em mulheres 34% (n=12) pode estar diretamente relacionada ao fato de que o Estado de Santa Catarina tem uma predominância de pacientes masculinos infectados pelo HIV (66%) em relação ao sexo feminino (34%) (SANTA CATARINA, 2004). A distribuição da faixa etária dos pacientes com criptococose está de acordo com os dados da literatura que mostram uma faixa etária média de 35 a 40 anos (Casali et al. 2003, Meyer et al. 2003).

As diferentes técnicas de biologia moleculares empregadas no presente estudo, com o intuito de caracterizar molecularmente as amostras de *C. neoformans* isoladas de pacientes portadores do HIV, fornecem dados novos sobre a epidemiologia da criptococose no Estado de Santa Catarina. No entanto, torna-se necessário ampliar este estudo para um número maior de amostras clínicas e inserir amostras ambientais do fungo, para que se possam obter maiores informações sobre ecologia e epidemiologia de *C. neoformans* no Estado de Santa Catarina.

6.0 CONCLUSÕES

A presença da cápsula polissacarídica em *C. neoformans* é um fator dificultador para extração de DNA genômico do fungo.

Os iniciadores CAP59R e CAP59F mostram-se sensíveis na amplificação do fragmento do gene CAP59 de *C. neoformans* nas amostras de DNA purificado, no entanto para as amostras de cultura e de líquido, a sensibilidade é baixa.

Os iniciadores CAP59R e CAP59F permitem a amplificação do fragmento do gene CAP59 de amostras de *C. neoformans* de cultura sem a extração prévia de DNA.

A tipificação de *C. neoformans* através de PCR-RFLP mostra-se reprodutível, rápida e economicamente mais vantajosa que o *kit* de sorotipagem Cripto Check[®].

As 35 amostras de *C. neoformans* isoladas no Estado de Santa Catarina pertencem ao tipo A (var. *grubii*) de acordo com a técnica de PCR-RFLP.

A PCR-*fingerprinting* das 35 amostras de *C. neoformans* isoladas no Estado de Santa Catarina agrupa 34 amostras como padrão molecular VNI e uma amostra como padrão molecular distinto.

Os perfis de RAPD utilizando os iniciadores 3303 e 3304 mostram uma baixa variabilidade genética das amostras de *C. neoformans*.

A análise comparativa das seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos preditos do fragmento do gene CAP59 seqüenciado das amostras isoladas no Estado de Santa Catarina (41 e 77) e amostra padrão ATCC-LMM794 (sorotipo A), indicam similaridade superior a 96% com as seqüências de amostras do sorotipo A e AD depositadas no Genbank.

7.0 PERSPECTIVAS

Ampliar este estudo com um maior número de amostras de origem clínica, ambiental e veterinária de diferentes regiões do Estado de Santa Catarina.

Padronizar a técnica de *nested* PCR, para detecção do fragmento do gene CAP59 de 597pb, em amostras clínicas.

8.0 REFERÊNCIAS

AKSENOV, S. I.; BABYEVA, I. P.; GOLUBEV, V. I. On the mechanism of adaptation of micro-organisms to conditions of extreme low humidity. *Life. Sci Space Res*, v.11, p.55-61. 1973.

ALSPAUGH, J. A.; DAVIDSON, R. C.; HEITMAN, J. Morphogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Contrib Microbiol*, v. 5, p. 217-238. 2000.

AOKI, F. H.; IMAI, T.; TANAKA, R.; MIKAMI, Y.; TAGUCHI, H.; NISHIMURA, N. F.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M.; SCHREIBER, A. Z.; BRANCHINI, M. L. New PCR primer pairs specific for *Cryptococcus neoformans* serotype A or B prepared on the basis of random amplified polymorphic DNA fingerprint pattern analyses. *J Clin Microbiol*. v.37, n.2, p.315-20. Feb.1999.

AULAKH, H. J.; STRAUSS, S. E.; KWON-CHUNG, K. J. Genetic relatedness of *Filobasidiella neoformans* (*Cryptococcus neoformans*) and *Filobasidiella bacillospora*

(*Cryptococcus bacillosporus*) as determined by deoxyribonucleic acid base composition and sequence homology studies. **Int. Syst. Bacteriol.** v. 31, p. 97–101. 1981.

BARCHIESI, F.; COGLIATI, M.; ESPOSTO, M. C.; SPREGHINI, E.; SCHIMIZZI, A. M.; WICKES, B.L.; SCALISE, G.; VIVIANI, M. A. Comparative analysis of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* serotypes A, D and AD in murine cryptococcosis. **J Infect.**, v.51, n.1, p.10-6 Jul. 2005.

BARRETO DE OLIVEIRA, M. T.; BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; HAGEN, F.; BARONI, F. A.; LAZERA, M. S.; LENGELER, K. B.; HEITMAN, J.; RIVERA, I. N.; PAULA, C. R. *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. **J Clin Microbiol.** v.42, n.3, p.1356-9, mar 2004.

BIALEK, R.; IBRICEVIC, A.; FOTHERGILL, A.; BEGEROW, D. Small subunit ribosomal DNA sequence shows *Paracoccidioides brasiliensis* closely related to *Blastomyces dermatitidis*. **J Clin Microbiol**, v.38, n.9, p.3190-3. Sep 2000.

BICANIC, T.; HARRINSON, T. S. Cryptococcal meningitis. **British Medical Bulletin.** v.72, n.1, p.99-118, jun. 2005.

BLOOMFIELD, N.; GORDON, M. A.; ELMENDORF, D. F. Detection of *Cryptococcus neoformans* antigen in body fluids by latex particle agglutination. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 114, p.64–67, mar.1963.

BOLANˆOS, B.; MITCHELL, T. G. Killing of *Cryptococcus neoformans* by rat alveolar macrophages. **J. Med. Vet. Mycol.** v. 27, p. 219–228. jan. 1989.

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 Res.** v.1, n.3, p.221-224, dec. 2001.

BOTTONE, E. J., WORMSER, G. P. Poorly encapsulated *Cryptococcus neoformans* from patients with AIDS. II. Correlation of capsule size observed directly in cerebrospinal fluid with that after animal passage. **AIDS Res**, v. 2, p. 219–225. feb. 1986.

BOZZETTE, S. A., LARSEN, R. A.; CHIU, J.; LEAL, M. A. E.; JACOBSEN, J.; ROTHMAN, P.; ROBINSON, G.; GILBERT, J. A.; MCCUTCHAN, J.; TILLES, J. M.; LEEDOM, D. D.; RICHMAN, T. C. ;MENG, K.; LARGE, M.; MCCARTHY, C.; FEGAN, S.; FITZGIBBONS, S.; BUELL, D. N. A placebo-controlled trial of maintenance therapy with fluconazole after treatment of cryptococcal meningitis in the acquired immunodeficiency syndrome. **N. Engl. J. Med.**, v. 324, p. 580–584. mar.1991.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE - Dados e pesquisa em DST e Aids. Coordenação do programa nacional de DTS/Aids. Brasília, 2002. Disponível em: <http://www.aids.gov.br>. Acessado em: 12 de novembro 2005.

BROUWER, A. E.; RAJANUWONG, A.; CHIERAKUL, W.; GRIFFIN, G. E.; LARSEN, R. A.; WHITE, N. J.; HARRISON, T. S. Combination antifungal therapies for HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomised trial. **Lancet**. v.29, n.363(9423), p.1764-1767, may. 2004.

BUCHANAN KL, MURPHY JW. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? **Emerg Infect Dis**. Review.v.4, n.1, p.71-83. Jan-Mar.1998.

BUTLER, M. J., DAY, A. W. Fungal Melanins: a review. **Can J Microbiol**. v. 44, p.1115-1136, 1998.

CASADEVALL, A.; FREUNDLICH, L. F.; MARSH, L.; SCHARFF, M. D. Extensive allelic variation in *Cryptococcus neoformans*. **J Clin Microbiol**. v.30, n.5, p.1080-4, may.1992.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*. Washington: ASM Press, Library of Congress, 541 pp. 1998.

CASADEVALL, A.; GOLDMAN, D. L.; KHINE, H.; ABADI, J.; LINDENBERG, D. J.; PIROFSKI, L.; NIANG, R.; CASADEVALL, A. Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. **Pediatrics**. v. 107, p. E66, 2001.

CASADEVALL, A.; STEENBERGEN, J. N.; NOSANCHUK, J.D. 'Ready made' virulence and 'dual use' virulence factors in pathogenic environmental fungi--the *Cryptococcus neoformans* paradigm. **Curr Opin Microbiol**. v.6, n.4, p.332-337, aug. 2003.

CASALI, A. K.; GOULART, L.; ROSA, E.; SILVA, L. K.; 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 Res.**,v.3, n.4, p.405-415. jun.2003.

CDC, Center for Disease control and Prevention. **Cryptococcosis**. Disponível em: <http://www.cdc.gov>. Atualizado em : outubro de 2005. Acesso em 11 de novembro de 2005.

CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. **Mol Cell Biol**, v.14, p. 4912-4919, jan. 1994.

CHANG, Y. C.; PENOYER, L. A.; KWON-CHUNG, K. J. The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans*, CAP64, is essential for virulence. **Infect Immun.** v. 64, n.6, p.1977-1983. jun.1996.

CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Isolation of the third capsule-associated gene, CAP60, required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v.66, p.2230-2236, mar.1998.

CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Isolation, characterization, and localization of a capsule-associated gene, CAP10, of *Cryptococcus neoformans*. **J Bacteriol**, v.181, p. 5636-5643, jun. 1999.

CHANG, Y. C.; WICKES, B. L.; MILLER, G. F.; PENOYER, L. A. ; KWON-CHUNG, K. J. *Cryptococcus neoformans* STE12alpha regulates virulence but is not essential for mating. **J. Exp. Med.** v.191, p. 871-882, 2000.

CHEN, S.; SORRELL, T.; NIMMO, G.; SPEED, B.; CURRIE, B.; ELLIS, D.; MARRIOTT, D.; PFEIFFER, T.; PARR, D.; BYTH, K. Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group. **Clin Infect Dis.**v.31, n.2, p.499-508, set., 2000.

CHERNIAK, R; O'NEILL, E. B.; SHENG, S. Assimilation of xylose, mannose, and mannitol for synthesis of glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans* determined by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Infect Immun.**, v.66, n.6, p. 2996-2998. jun. 1998.

COGLIATI, M; ALLARIA, M; TORTORANO, A. M; VIVIANI, M. A. Genotyping *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* with specific primers designed from PCR-fingerprinting bands sequenced using a modified PCR-based strategy. **Med Mycol.** v.38, n. 2, p.97-103, apr. 2000.

COX, G. M.; MUKHERJEE, J.; COLE, G. T.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infect Immun.**, v. 68, n.2, p. 443-448. feb. 2000.

COX, G. M.; MCDADE, H. C.; CHEN, S. C.; TUCKER, S. C.; GOTTFREDSSON, M.; WRIGHT, L. C.; SORRELL, T. C.; LEIDICH, S. D.; CASADEVALL, A.; GHANNOUM, M. A.; PERFECT J. R.. Extracellular Phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol.**v.39, n.1, p166-75, jan.2001.

COX, G. M.; HARRISON, T. S.; MCDADE, H. C.; TABORDA, C. P.; HEINRICH, G.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. **Infect Immun.**v.71, n.1, p.173-80.jan.2003.

CRUZ, M. C.; FOX, D. S.; HEITMAN, J. Calcineurin is required for hyphal elongation during mating and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*. **EMBO J.**, v.20, n.5, p.1020-32. mar 2001.

CURRIE, B. P.; CASADEVALL, A. Estimation of the prevalence of cryptococcal infection among HIV infected Individuals in New York City. **Clin Infect Dis**, v.19, p.1029- 1033, jun. 1994.

CURRIE, B. P.; L. F. FREUNDLICH, A. CASADEVALL. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Cryptococcus neoformans* isolates from environmental (pigeon excreta) and clinical sources in New York City. **J. Clin. Microbiol.** v.32, p.1188–1192, mar. 1994.

CURTIS, P. H.; HALLER, J. A.; DE JUAN, E. An unusual case of cryptococcal endophthalmitis. **Retina**, v.15, p. 300-304, 1995.

DEL POETA, M. D; TOFFALETTI, D. L.; RUDE, T. H.; DYKSTRA, C. C.; HEITMAN, J.; PERFECT, J. R. Topoisomerase I is essential in *Cryptococcus neoformans*: role in pathobiology and as an antifungal target. **Genetics**, v. 152, p. 167–17, mar., 1999.

DOERING, T. L.; NOSANCHUK, J. D.; ROBERTS, W. K.; CASADEVALL, A. Melanin as a potential cryptococcal defence against microbicidal proteins. **Med Mycol.**, v.37, n.3, p.175-81, jun. 1999.

DRIVINYA, A.; SHIMIZU, K.; TAKEO, K. Construction of a complete URA5 deletion strain of a human pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v.45, n.1p.1-6. 2004.

DROMER, F., VARMA, A.; RONIN, O.; MATHOULIN, S.; DUPONT, B. Molecular typing of *Cryptococcus neoformans* serotype D clinical isolates. **J. Clin. Microbiol.** v.32, p.2364–2371, jun. 1994.

DROMER, F.; MOULIGNIER, A.; DUPONT, B.; GUEHO, E.; BAUDRIMONT, M.; IMPROVISI, L.; PROVOST, F.; GONZALEZ-CANALI, G. Myeloradiculitis due to *Cryptococcus curvatus* in AIDS. **AIDS**. v.9. n.4, p.395-396. apr.1995.

D'SOUZA, C.A.; HEITMAN, J. It infects me, it infects me not: phenotypic switching in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **J Clin Invest.**, v.108, n.11, p.1577-1578. dec. 2001.

D'SOUZA, C.A.; HAGEN, F.; BOEKHOUT, T.; COX, G. M.; HEITMAN, J. Investigation of the basis of virulence in serotype A strains of *Cryptococcus neoformans* from apparently immunocompetent individuals. **Curr Genet.**, v. 46, n.2 p. 92-102, may. 2004.

DUTRA, S.; MACHADO, R., RÉ, J.; ROSSINI, M., Estudos dos casos suspeitos de criptococose através do diagnóstico laboratorial e clínico dos pacientes cujas amostras foram encaminhadas à seção de micologia do LACEN-SC, no período de julho de 2003 á dezembro de 2004. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v.38, sup. n.0037-882, 2005.

ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Ecology, life cycle, and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. **Lancet**, v.336, p.923-925, jan. 1990.

ELLIS, D.; MARRIOTT, D.; HAJJEH, R. A.; WARNOCK, D.; MEYER, W. BARTON R. Epidemiology: surveillance of fungal infections. Review. **Med Mycol.** v. 38, Suppl 1, p. 173-82, jun. 2000.

ERKE, K. H.. Light microscopy of basidia, basidiospores, and nuclei in spores and hyphae of *Filobasidiella neoformans* (*Cryptococcus neoformans*). **J. Bacteriol.** v.128, p. 445-455, mar.1976.

ESPOSTO, M. C.; COGLIATI, M.; TORTORANO A. M.; VIVIANI, M. A. Determination of *Cryptococcus neoformans* var.*neoformans* mating type by multiplex PCR. **Clin Microbiol Infect.**, v.10, n.12, p. 1092-1094. dec. 2004.

FELDMESSER, M.; KRESS, Y.; MEDNICK, A.; CASADEVALL, A. The effect of the echinocandin analogue caspofungin on cell wall glucan synthesis by *Cryptococcus neoformans*. **J. Infect Dis.**, v.182, n.6, p. 1791-5, dec., 2000.

FELDMESSER, M.; TUCKER, S.; CASADEVALL, A. Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. **Trends Microbiol.** Review. v.9, n.6, p.273-278, jun; 2001.

FERNANDES, O. F. L.; PASSOS, X. S.; SOUZA, L. K. H.; MIRANDA, A. T. B; CERQUEIRA, C. H. P. V.; SILVA, M. R. R. In Vitro susceptibilidade characteristics of *Cryptococcus neoformans* varieties from AIDS patients in Goiânia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.98, n.6, p.839-841, sept. 2003.

FRANZOT, S. P.; HAMDAN, J. S.; CURRIE, B. P.; CASADEVALL, A. - Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Brazil and the United States: evidence for both local genetic differences and a global clonal population structure. **J. clin. Microbiol**, v.35, p. 2243-2251, mar. 1997.

FRANZOT, S.P.; SALKIN, I.F.; CASADEVALL, A. - *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **J. clin. Microbiol.**,v. 37, p. 838-840, jan. 1999.

FRIES BC, TABORDA CP, SERFASS E, CASADEVALL A. Phenotypic switching of *Cryptococcus neoformans* occurs in vivo and influences the outcome of infection. **J. Clin Invest.**, v.108, n.11, p.1639-48. dec. 2001.

FUJIMURA, H.; SAKUMA, Y. Simplified isolation of chromosomal and plasmid DNA from yeasts. **Biotechniques**. v.14, n.4, p.538-540. apr. 1993.

GARCIA-RIVERA, J.; CASADEVALL, A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* reduces its susceptibility to the antimicrobial effects of silver nitrate. **Med. Mycol.**v.39, n.4, p.353-357, aug. 2001.

GATES, M. A.; THORKILDSON, P.; KOZEL, T. R. Molecular architecture of the *Cryptococcus neoformans* capsule. **Mol. Microbiol**. v. 52, n.1, p.13-24, apr.2004.

GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin Microbiol Rev. Review**. v.13, n.1, p.122-143, table of contents. jan. 2000.

GLUCK, J. L.; MYERS, J. P.; PASS, L. M. Cryptococemia due to *Cryptococcus albidus*. **South Med J**.v.80, n.4, p.511-513. apr. 1987.

GOLDMAN, D.L.; FRIES, B.C.; FRANZOT. S. P.; MONTELLA, L.; CASADEVALL, A. Phenotypic switching in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* is associated with changes in virulence and pulmonary inflammatory response in rodents. **Proc. Natl. Acad. Sci U S A**. v.8, n.95(25), p.14967-72. dec.1998.

GOLDMAN, D.L.; KHINE, H.; ABADI, J.; LINDENBERG, D.J.; PIROFSKI, L. A.; NIANG, R.; CASADEVALL, A. Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. **Pediatrics**. v.107, n.5, may. 2001.

GRANGER, D. L., PERFECT, J. R., DURACK, D. T. Virulence of *Cryptococcus neoformans*. Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. **J. Clin. Invest.** v.76, p.508-516. 1985.

HALLIDAY, C. L.; BUI, T.; KROCKENBERGER, M.; MALIK, R.; ELLIS, D. H.; CARTER, D. A.; Presence of alpha and a mating types in environmental and clinical collections of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* strains from Australia. **J. Clin Microbiol.** v. 37, n.9, p.2920-6. Sep.1999.

HAMANN, I. D.; GILLESPIE, R. J. ; FERGUSON, J. K. Primary cryptococcal cellulitis caused by *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in a immunocompetent host. **Aust J. Dermatol**, v. 38, p. 29-32, 1997.

HORTA, J. A; STAATS, C. C.; CASALI, A. K.; RIBEIRO, A. M.; SCHRANK, I. S; SCHRANK, A; VAINSTEIN, M. H. Epidemiological aspects of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **Med. Mycol.** v.40, n.6, p.565-71. dec.2002.

HULFNAGLE, K. E., GANDER, R. M. Evaluation of Gen-Probe's Histoplasma capsulatum and *Cryptococcus neoformans* AccuProbes. **J. Clin. Microbiol.** v.31, p.419-421, 1993.

HUFFNAGLE, G. B.; CHEN, G. H.; CURTIS, J. L.; MCDONALD, R. A.; STRIETER, R. M.; TOEWS, G. B. Down-regulation of the afferent phase of T cell-mediated pulmonary inflammation and immunity by a high melanin-producing strain of *Cryptococcus neoformans*. **J. Immunol.** v.1, n.155(7), p.3507-16, oct. 1995.

IKEDA, R.; SHINODA, T.; FUKAZAWA, Y.; KAUFMAN, L.; Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. **J Clin. Microbiol.** v.16, n.1, p.22-9. jul. 1982.

KABASAWA, K.; ITAGAKI, H. IKEDA, R.; SHINODA, T.; KAGAYA, K.; FUKAZAWA. Y. Evaluation of a new method for identification of *Cryptococcus neoformans* which uses serologic tests aided by selected biological tests. **J.Clin. Microbiol.**v.29, p.2873–2876. 1991.

KANBE, T.; ARISHIMA, T.; HORII, T.; KIKUCHI, A. Improvements of PCR-based identification targeting the DNA topoisomerase II gene to determine major species of the opportunistic fungi *Candida* and *Aspergillus fumigatus*. **Microbiol Immunol**, v.47, n.9, p.631-8, jun. 2003.

KATSU M, KIDD S, ANDO A, MORETTI-BRANCHINI ML, 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 Res.** v.4, n.45, p.377-88, jan. 2004.

KAWAKAMI K. Regulation by innate immune T lymphocytes in the host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. **Jpn J. Infect Dis** Aug, v. 57, n.4, p.137-45. 2004.

KIDD, S. E.; HAGEN, F.; TSCHARKE, R. L.; HUYNH, M.; BARTLETT, K. H.; FYFE, M.; MACDOUGALL, L.; BOEKHOUT, T.; KWON-CHUNG, K. J.; MEYER, W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.101, n.49, p.17258-63, dec. 2004.

KNOKE, M.; SCHWESINGER, G. One hundred years ago: the history of cryptococcosis in Greifswald. Medical mycology in the nineteenth century. **Mycoses**, v.37, p. 229-233, 1994.

KOTWANI, R. N.; GOKHALE, P. C.; BODHE, P. V.; KIRODIAN, B. G.; KSHIRSAGAR, N. A. Safety and efficacy of liposomal amphotericin B in patients with cryptococcal meningitis. **Assoc Physicians India**. v.49, p.1086-90, nov. 2001.

KOZEL, T. R.; PFROMMER, G. S.; GUERLAIN, A. S.; HIGHISON, B. A.; HIGHISON, G. J. Strain variation in phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*: dissociation of susceptibility to phagocytosis from activation and binding of opsonic fragments of C3. **Infect Immun**. v.56, n.11, p.2794-800, nov. 1988.

KUMAR, P.; SARAN, R. K.; GONDAL, R.; MALHOTRA, V. Smear morphology of cryptococcosis presenting as a subcutaneous swelling in healthy adults: a report of three cases. **Cytopathology**. v.16, n.3, p.143-6, jun.2005.

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

KWON-CHUNG, K.J. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. **Mycologia**.v. 68, p.943-946, 1976a.

KWON-CHUNG, K. J. Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. **Mycologia**, v.68, p.821-833, 1976b.

KWON-CHUNG, K. J.; HILL, W. B.; BENNETT, J. E. New, special stain for histopathological diagnosis of cryptococcosis. **J. Clin Microbiol**, v.13, n.2, p. 383-7. nov. 1981.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHEK, I.; BENNETT, J. E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotype B and C). **J. Clin Microbiol.** v. 15, p. 535-537, jun. 1982.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Am. J. Epidemiol.** v.120, p.123-130, jun., 1984.

KWON-CHUNG, K. J.; EDMAN, J. C.; WICKES, B. L.; Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun.**, v. 60, n.2, p. 602-5. feb. 1992.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Cryptococcosis. In: KWON-CHUNG, K. J. BENNETT, J. E., eds. **Medical Mycology**. Philadelphia, Lea; Febiger, p. 397-445, 1992.

KWON-CHUNG, K. J.; SORRELL, T. C.; DROMER, F.; FUNG, E.; LEVITZ, S. M. Cryptococcosis: clinical and biological aspects. **Med Mycol.** v.38, Supp.1 1, p. 205-13, jan. 2000.

LACAZ, C. S; PORTO, E; HEINS-VACCARI, E. M; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica**. 9. ed. São Paulo, Sarvier, 2002.

LALLOO, U. G.; AMOD, F. C. HIV-associated Tuberculosis and Cryptococcosis in Resource-limited Settings. **Curr HIV/AIDS Rep.**v.2, n.3, p.116-121. aug. 2005.

LAZERA, M. S.; PIRES, F. D.; CAMILLO-COURA, L.; NISHIKAWA, M. M.; BEZERRA, C. C.; TRILLES, L; WANKE, B. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. **J. Med Vet Mycol.**v.34, n.2, p.127-31. mar-apr.1996.

LAZERA, M. S.; CAVALCANTI, M. A.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M. M.; WANKE, B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*--evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. **Med Mycol.**v.36, n.2, p.119-22. apr. 1998.

LENGELER, K. B.; DAVIDSON, R. C.; D'SOUZA, C.; HARASHIMA, T.; SHEN, W. C.; WANG, P.; PAN, X.; WAUGH, M.; HEITMAN, J. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. **Microbiol Mol Biol** . v.64, n.4, p.746-85, dec. 2000.

LEVITZ, S. M. The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. **Rev Infect Dis.** Review. v. 13, n.6, p.1163-9. nov-dec 1991.

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

LITVINTSEVA, A. P.; KESTENBAUM, L.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T. G. Comparative analysis of environmental and clinical populations of *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin Microbiol**. v.43, n.2, p.556-64, nov-dec. 2005.

LIU, L., TEWARI, R. P., WILLIAMSON, P. R.. Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from Antifungal Activity of Alveolar Macrophages. **Infect. Immun**. v.67, p. 6034-6039.1999

LOFTUS BJ, FUNG E, RONCAGLIA P, ROWLEY D, AMEDEO P, BRUNO D, VAMATHEVAN J, MIRANDA M, ANDERSON IJ, FRASER JA, ALLEN JE, BOSDET IE, BRENT MR, CHIU R, DOERING TL, DONLIN MJ, D'SOUZA CA, FOX DS, GRINBERG V, FU J, FUKUSHIMA M, HAAS BJ, HUANG JC, JANBON G, JONES SJ, KOO HL, KRZYWINSKI MI, KWON-CHUNG JK, LENGELER KB, MAITI R, MARRA MA, MARRA RE, MATHEWSON CA, MITCHELL TG, PERTEA M, RIGGS FR, SALZBERG SL, SCHEIN JE, SHVARTSBEYN A, SHIN H, SHUMWAY M, SPECHT CA, SUH BB, TENNEY A, UTTERBACK TR, WICKES BL, WORTMAN JR, WYE NH, KRONSTAD JW, LODGE JK, HEITMAN J, DAVIS RW, FRASER CM, HYMAN RW. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Science**. v.25, n.307(5713), p.1321-4. feb. 2005.

MA, L. L. ; MODY, C. H. When there is a fungus among us, what makes it virulent? **Am J. respir Cell mol Biol**. v. 26, p. 273-276, 2002.

MANFREDI, R.; CALZA, L.; CHIODO, F. AIDS-associated *Cryptococcus* infection before and after the highly active antiretroviral therapy era: emerging management problems. **Int J. Antimicrob Agents**.v.22, n.4, p.449-52. oct. 2003.

MARRA, R. E.; HUANG, J. C.; FUNG, E.; NIELSEN, K.; HEITMAN, J.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T. G. A genetic linkage map of *Cryptococcus neoformans* variety *neoformans* serotype D (*Filobasidiella neoformans*). **Genetics**. v. 167, n.2, p. 619-31.jan. 2004.

MCCLELLAND, C. M.; CHANG, Y. C.; VARMA, A.; KWON-CHUNG, K. J. Uniqueness of the mating system in *Cryptococcus neoformans*. **Trends Microbiol**.v.12, n.5, p.208-12. may., 2004.

MELO, N. T.; LACAZ, C. S.; CHARBEL, C. E.; PEREIRA, A. D.; HEINS-VACCARI, E. M.; FRANÇA-NETTO, A. S.; MACHADO, L. R.; LIVRAMENTO, J. A. Quimiotipagem de *Cryptococcus neoformans*. Revisão da literatura. Novos dados epidemiológicos sobre a criptococose. Nossa experiência com o emprego do meio de CGB no estudo daquela levedura. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v.35, n. 5, p. 469-478, out-set., 1993.

MEYER, W.; MARSZEWSKA, K.; AMIRMOSTOFIAN, M.; IGREJA, RP.; HARDTKE, C.; METHLING, K.; VIVIANI, M. A.; CHINDAMPORN, A.; SUKROONGREUNG, 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.1790-9. jun.1999.

MEYER, W.; CASTAÑEDA, A., JACKSON, S. et al. - Molecular typing of Iberoamerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerg. infect. Dis.** v. 9, p.189-195, 2003.

MITCHELL, T. G.; FREDMAN, E. Z.; WHITE, T. J.; TAYLOR. J. W. Unique oligonucleotide primers in PCR for identification of *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Microbiol.**v.32, p.253-255. 1994.

MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Rev Clin Microbiol.** v. 8, p. 515-548, 1995.

MONARI, C.; KOZEL, T. R.; BISTONI, F.; VECCHIARELLI, A. Modulation of C5aR expression on human neutrophils by encapsulated and acapsular *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun.**v.70, n.7, p.3363-70. jul. 2002.

NAKAMURA, Y.; KANO, R.; WATANABE, S.; HASEGAWA, A. Molecular analysis of CAP59 gene sequences from five serotypes of *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin Microbiol.**, v. 38, n.3, p.992-5, mar., 2000.

NISHIKAWA, M. M.; LAZERA, M. S.; BARBOSA, G.G.; TRILLES, L.; BALASSIANO, B. R.; MACEDO, R. C.BEZERRA, C. C.; PEREZ, M. A.; CARDARELLI, P.; WANKE, B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. **J. clin. Microbiol.** v. 41, p. 73-77, jan. 2003.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Cellular charge of *Cryptococcus neoformans*: contributions from the capsular polysaccharide, melanin, and monoclonal antibody binding. **Infect Immun.**,v.65, p.1836-1841, 1997.

OHKUSU, M.; TANGONAN, N.; TAKEO, K.; KISHIDA, E.; OHKUBO, M.; AOKI, S.; NAKAMURA, K.; FUJII, T.; SIQUEIRA, I. C.; MACIEL, E. A.; SAKABE, S.; ALMEIDA, G. M.; HEINS-VACCARI, E. M.; LACAZ, C. D. A. S. Serotype, mating type and ploidy of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from patients in Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.**v.44, n.6, p.299-302.nov-dec;2002.

OKABAYASHI, K.; KANO, R.; SIROUZU, K.; YANAI, T.; MIZUNO, M.; YAMAMURA, H.; SAEGUSA, S.; HASEGAWA, A. Detection of CAP59 gene in 2 feline cases of systemic cryptococcosis. **J. Vet Med Sci.**, v. 65, n. 8, p953-5, aug., 2003.

PAPPALARDO, M. C.; MELHEM, M. S. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** v. 45, n.6, p.299-305, nov-dec.2004.

PERFECT, J. R., B. B. MAGEE, AND P. T. MAGEE. Separation of chromosomes of *Cryptococcus neoformans* by pulsed-field gel electrophoresis. **Infect. Immun.** 5v.7, p.2624–2627. 1989.

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D.J. In vitro susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species to itraconazole: global survey of 9,359 isolates tested by clinical and laboratory standards institute broth microdilution methods. **J. Clin Microbiol.** v.43, n.8, p.3807-10, aug., 2005.

POLACHECK, I.; LEBENS, G. A. Electrophoretic karyotype of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **J. Gen. Microbiol.** v.135, p.65–71. 1989.

POLACHECK, I., HEARING, V.J., KWON-CHUNG, K.J. Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. **J. Bacteriol.** v. 150, p. 1212-1220, 1982.

POWDERLY, W. G. Cryptococcal meningitis and AIDS. **Clin Infect Dis.** Review. v.17, n.5, p.837-42. nov. 1993.

REIS-FILHO, J. B.; NEVES, A. C.; ZYMBERG, S. T. ; OLIVEIRA, R.M.C. - O líquido cefalorraquiano inicial nas meningoencefalites por *Cryptococcus neoformans*. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, Review. v. 27, p. 173-178, may.1985.

REY, A.; KLAUS, B.; LENGELER; HEITMAN, J. Diploid Strains of the Pathogenic Basidiomycete *Cryptococcus neoformans* Are Thermally Dimorphic Fungal Genetics and Biology. v. 29, p. 153–163. mar. 2000.

REY, M.C. W., LEIRIA, T. L. L.; ANSEMI, C. E.; FLORES, A.; MEZZARI, A.; WIEBBELLING, A. P.; ANTUNES, H. B. *Cryptococcus neoformans*: epidemiologia, microbiologia, clínica e terapêutica. **Pesquisa Méd** (Porto Alegre), v. 33, n.1, p. 61-67, 1999.

RICHARDON, M. D.; WARNOCK, D. W. Fungal Infection: diagnosis and management. Blackwell Scientific publications, 1993.

RIVERA J, FELDMESSER M, CAMMER M, CASADEVALL A. Organ-dependent variation of capsule thickness in *Cryptococcus neoformans* during experimental murine infection. **Infect Immun.** v.66, n.10, p.5027-30. oct. 1998.

ROSAS, A. L.; CASADEVALL, A. Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. **FEMS Microbiol Lett.** v.15, n.153(2), 265-72, oct. 1997.

RUMA, P., S. C. CHEN, T. C. SORRELL, AND A. G. BROWNLEE. Characterization of *Cryptococcus neoformans* by random DNA amplification. **Lett. Appl. Microbiol.** v.23, p.312-316, 1996.

SAAG, M. S.; GRAYBILL, R. J.; LARSEN, R. A. PAPPAS, P.G.; PERFECT, J. R.; POWDERLY, W. G.; SOBEL, J.D.; DISMUKES, W. E. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect.**, v.30, p.710-718, apr., 2000.

SANTA CATARINA. Sistema Único de Saúde - Secretaria de Estado da Saúde - Diretoria de Vigilância Epidemiológica: **Informativo Epidemiológico "Barriga Verde"**. V. II, nº02, 2004.

SHADOMY, H. J. Clamp connections in two strains of *Cryptococcus neoformans*, In: AHEARN, D. G. (ed.), **Recent Trends in Yeast Research**. Georgia State University, Atlanta, p. 67-72, 1970.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica. 1ª ed. **Guanabara Koogan**, p. 1999.

SORRELL, T. C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. **Med Mycol**, vol. 39, p.155-168, 2001.

SPITZER, E. D.; SPITZER, S. G. Use of a dispersed repetitive DNA element to distinguish clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. **J Clin Microbiol.** v.30, n.5, p.1094-7. may.1992.

SPITZER, E. D., S. G. SPITZER, L. F. FREUNDLICH, A. CASADEVALL. Persistence of initial infection in recurrent *Cryptococcus neoformans* meningitis. **Lancet** v.341, p.595-596, feb. 1993.

SPITZER, S.G.; SPITZER, E. D.; Characterization of the CNRE-1 family of repetitive DNA elements in *Cryptococcus neoformans*. *Gene*. v.24, n.144(1), p.103-6.feb. 1994.

STAIB, F. *Cryptococcus neoformans* and *Guizotia abyssinica* (syn. *G. oleifera* D.C.) (farbreadaktion für *C. neoformans*). **Z. Hyg.** v. 148, p.466-475, may. 1962.

STEENBERGEN JN, SHUMAN HA, CASADEVALL A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.18, n.26, p.15245-50. jun. 2001.

STEINDEL, M.; DIAS NETO, E.; DE MENEZES, C. L.; ROMANHA, A. J.; SIMPSON, A. J. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. **Mol Biochem Parasitol**, v.60, n.1, p.71-9. jul. 1993.

ST GERMAIN, G.; BEAUCHESNE, D. Evaluation of the MicroScan Rapid Yeast Identification panel. **J. Clin Microbiol**, v.29, n. 10, p. 2296-9, oct. 1991.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; RADONJIC, I.; DIMITRIJEVIC, V.; SVABIC-VLAHOVIC, M. Ground red hot pepper agar in the isolation and presumptive identification of *Cryptococcus neoformans*. **Mycoses**. v.45, n.9-10, p.384-8, nov. 2002.

SUGITA, T.; SAITO, M.; KATO, Y.; TSUBOI, R.; TAKEUCHI, S.; NISHIKAWA, A. The basidiomycetous yeasts *Cryptococcus diffluens* and *C. liquefaciens* colonize the skin of patients with atopic dermatitis. **Microbiol Immunol**. v.47, n.12, p.945-50 . 2003.

THOMPSON, H. J. Not your "typical patient": cryptococcal meningitis in an immunocompetent patient. **J. Neurosci Nurs**. Review . v.37, n.3, p.144-8.jun. 2005.

TOFFALETTI, D. L.; NIELSEN, K.; DIETRICH, F.; HEITMAN, J.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans* mitochondrial genomes from serotype A and D strains do not influence virulence. **Curr Genet**. v.46, n.4, p.193-204. oct. 2004.

TRILLES, L.; LAZERA, M.; WANKE, B.; THEELEN, B.; BOEKHOUT, T. Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. **Med Mycol**, v.1, n.5, p.383-90.oct., 2003.

TSCHARKE, R. L.; LAZERA, M.; CHANG, Y. C.; WICKES, B. L.; KWON-CHUNG, K. J.; Haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans* is not mating type alpha-specific. **Fungal Genet Biol**, v. 39, n.3, p. 230-7. aug., 2003.

TUCKER, S. C.; CASADEVALL, A. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 5 n.99(5), p. 3165-70, mar. 2002.

VAN DER HORST, C. M.; SAAG, M. S.; CLOUD, G. A.; HAMILL, R. J.; GRAYBILL, J. R.; SOBEL, J. D.; JOHNSON, P. C.; TUAZON, C. U.; KERKERING, T.; MOSKOVITZ, B. L.; POWDERLY, W. G.; DISMUKES, W. E. Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired immunodeficiency syndrome. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group and AIDS Clinical Trials Group. **N. Engl. J. Med.** v.3, n. 337, p.15-21, jul., 1997.

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J.D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrob Agents Chemother.** v.46, n. 11, p. 3394-400. nov. 2002.

VARMA, A.; KWON-CHUNG, K. J. Rapid method to extract DNA from *Cryptococcus neoformans*. **J Clin Microbiol.** v. 29, n.4. p.810-2, apr .1991.

VARMA, A., K. J. KWON-CHUNG. DNA probe for strain typing of *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Microbiol.** v.30, p.2960–2967, mar.1992.

VARMA, A., D. SWINNE, F. STAIB, J. E. BENNETT, AND K. J. KWON-CHUNG. Diversity of DNA fingerprints in *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Microbiol.** v.33, p,1807-1814, may. 1995.

VARTIVARIAN, S. E.; ANAISSIE, E. J.; COWART, R.E.; SPRIGG, H. A.; TINGLER, M.J; JACOBSON, E. S. Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. **J. Infect Dis.** v.167, p.186–190, mar. 1993.

VECCHIARELLI, A.; RETINI, C.; MONARI, C.; TASCINI, C.; BISTONI, F.; KOZEL, T. R. Purified capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* induces interleukin-10 secretion by human monocytes. **Infect Immun.** v.64, n.7, p. 2846-9, jul. 1996.

VECCHIARELLI, A. Immunoregulation by capsular components of *Cryptococcus neoformans*. **Med Mycol.** Review. v.38, n.6, p.407-17. dec, 2000.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. **Infect. Immun.** v.62, n.7, p.3004-7, jul. 1994.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. **Infect. Immun.** v. 63, n.8, p. 3131-6, aug. 1995.

WARREN, N. G., SHADOMY, H. J., Yeast of medical importance, In A. Balows, W. J. Hausler, Jr., K. L Herrman, H. D. Idenberg, and H. J. Shadomy (ed), Manual of clinical microbiology, 5th ed. **American Society for Microbiology**, Washington, D. C. p.617-629, mar. 1991.

WICKES, B. L.; MOORE, T. D. E. K.; KWON-CHUNG, J. Comparison of the electrophoretic karyotypes and chromosomal location of ten genes in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology.** v.140, p.543-550. 1994.

WICKES, B. L. The role of mating type and morphology in *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Int J Med Microbiol.** v.292, n.(5-6), p.313-29. oct. 2002.

XU, J.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T. G. Multiple gene genealogies reveal recent dispersion and hybridization in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Mol Ecol.** v.9, n.10, p.1471-81, mar. 2000.

XU, J., MITCHELL, G. Comparative gene genealogical analyses of strains of serotype AD identify A e D the human pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v.149, p. 2147-2154, jun. 2003.

ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. **Biol Proced Online.** v.6, p.10-15.mar. 2004.

ZERPA, R.; HUICHO, L.; GUILLEN, A. Modified India ink preparation for *Cryptococcus neoformans* in cerebrospinal fluid specimens. **J Clin Microbiol.** v. 34, n.9, p. 2290-1, sep. 1996.

ZHU, X.; GIBBONS, J.; GARCIA-RIVERA, J.; CASADEVALL, A.; WILLIAMSON, P. R. Laccase of *Cryptococcus neoformans* Is a Cell Wall-Associated Virulence Factor. **Infect. Immun.** v. 69, p. 5589-5596, jan. 2001.

ZHU, X.; WILLIAMSON, P. R. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans* in press. **FEMS Yeast Research.** v.5, n.1, p.1-10. oct. 2004.