

**MIONI THIELI FIGUEIREDO MAGALHÃES**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE ISOLADOS DE *Cryptococcus gattii***

**BELÉM  
2005**

**MIONI THIELI FIGUEIREDO MAGALHÃES**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE ISOLADOS DE *Cryptococcus gattii***

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Mestrado em Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Dra. Márcia dos Santos Lazéra  
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Marconi Fortes Magalhães

**BELÉM  
2005**

---

Magalhães, Mioni Thieli Figueiredo.

Caracterização fenotípica de isolados de *Cryptococcus gattii* / Mioni Thieli Figueiredo; orientador, Dra. Márcia dos Santos Lazéra. - Belém: [s.n.], 2005.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical, 2005.

1. *Cryptococcus gattii*. 2. Doença-Fungo. I. Título.

CDD 21.ed.:616.969

---

**MIONI THIELI FIGUEIREDO MAGALHÃES**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE ISOLADOS DE *Cryptococcus gattii***

Dissertação aprovada como requisito final para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais, área de concentração Patologia das Doenças Tropicais, do Curso de Mestrado em Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará, pela Comissão formada pelos professores:

**Orientadora:** Dra. Márcia dos Santos Lazéra  
Laboratório de Micologia Ambiental, IPEC/FIOCRUZ

**Co-orientador:** Prof. Dr. Luiz Marconi Fortes Magalhães  
Núcleo Pedagógico Integrado, UFPA

**Membros:** Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento  
Centro de Ciências Biológicas, UFPA

Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva  
Centro de Ciências Biológicas, UFPA

Dr. Cláudio Guedes Salgado  
Núcleo de Medicina Tropical, UFPA

**Suplente:** Dr. Arival Cardoso de Brito  
Núcleo de Medicina Tropical, UFPA

**Conceito Obtido: Excelente**

Belém, 25 de fevereiro de 2005

## **O QUE É O QUE É?**

**Gonzaguinha**

*E a vida?*

*E a vida o que é, diga lá meu irmão*

*Ela é a batida de um coração*

*Ela é uma doce ilusão*

*Mas e a vida?*

*Ela é maravilha ou é sofrimento?*

*Ela é alegria ou lamento?*

*O que é, o que é meu irmão*

*Há quem fale que a vida da gente é um nada no mundo*

*É uma gota no tempo*

*Que não dá um segundo*

*Há quem fale que é um divino mistério profundo*

*É o sopro do Criador, numa atitude repleta de amor*

*Você diz que é luta e prazer*

*Ele diz que a vida é viver*

*Ela diz que melhor é morrer*

*Pois amada não é e o verbo é sofrer*

*Eu só sei que confio na moça*

*E na moça eu ponho a força da fé*

*Somos nós que fazemos a vida*

*Como der, ou puder ou quiser*

*Sempre desejada, por mais que esteja errada*

*Ninguém quer a morte, só saúde e sorte*

*E a pergunta roda e a cabeça agita*

*E eu fico com a pureza da resposta das crianças*

*É a vida, é bonita e é bonita...*

*Viver e não ter a vergonha de ser feliz*

*Cantar e cantar e cantar*

*A beleza de ser um eterno aprendiz*

*Eu sei que a vida devia ser bem melhor, e será!*

*Mas isso não impede que eu repita:*

*É bonita, é bonita e é bonita!*

*Bom mesmo é ir à luta com determinação  
Abraçar a vida e viver com paixão  
Perder com classe e vencer com ousadia  
Pois o triunfo pertence a quem mais se atreve  
E a vida é muito para ser insignificante.*

**Charles Chaplin**

Aos meus pais,  
***Marconi e Marlene***  
de quem recebi o legado mais precioso:  
o acesso ao conhecimento.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, porque por Ele e para Ele são todas as coisas.

Aos meus pais, Marconi e Marlene Magalhães, que desde os primeiros passos, me ensinaram e me conduziram por um caminho sábio: o caminho do conhecimento.

Às minhas irmãs, Miucha Magalhães e Mineli Noronha e ao meu cunhado Francisco Noronha, sempre presentes nas horas fáceis e difíceis.

A minha orientadora e amiga, Dra. Márcia dos Santos Lazéra, pela firmeza na condução da ciência e pela doçura na condução da vida.

Ao Dr. Bodo Wanke, que de forma peculiar e única esteve sempre disponível no apoio científico.

A Gláucia Barbosa, Luciana Trilles, Cláudia Bezerra, Bernardina Morales e Regina Macedo, do Laboratório de Micologia Ambiental do Instituto de Pesquisa Clínica Hospital Evandro Chagas – FIOCRUZ, pela presteza no conhecimento e pelo apoio na prática laboratorial.

Aos amigos dos laboratórios de Diagnóstico Micológico, Sorologia e Biologia Molecular do IPEC – FIOCRUZ, pelo apoio na construção deste trabalho.

Aos amigos Manoel Santos e Andréia Medeiros, pelo apoio e amizade que se fundiram entre o científico e o pessoal.

Ao Instituto de Pesquisa Clínica Hospital Evandro Chagas – IPEC / FIOCRUZ por permitir a realização deste trabalho.

Ao Núcleo de Medicina Tropical da UFPa, por conceder a liberação necessária para a construção deste trabalho.

A todos, que direta ou indiretamente contribuíram para o êxito deste trabalho.

## RESUMO

*Cryptococcus neoformans* foi descrito como patógeno humano em 1894. Desde então, estudos abrangendo aspectos da biologia, taxonomia, ecologia e epidemiologia do fungo, vêm se desenvolvendo com significativa importância para a medicina e para o meio ambiente. O fungo foi recentemente classificado em duas espécies distintas, *C. neoformans* (sorotipo A, D e AD) e *C. gattii* (sorotipos B e C), cada uma com características morfológicas e genéticas bem definidas, assim como seus aspectos ecológicos e epidemiológicos. *C. neoformans* acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos, especialmente aqueles infectados pelo HIV, enquanto *C. gattii* infecta principalmente indivíduos imunocompetentes, atingindo todas as faixas etárias. Os fatores principais que determinam a patogênese da criptococose são relacionados com a situação de defesa do hospedeiro, o tamanho do inóculo e a virulência da cepa, sendo este último determinado por quatro características principais: a cápsula polissacarídica, a produção de melanina, a diferença de tipos sexuais ( $MAT\alpha$  e  $MATa$ ) e a termotolerância. O fungo possui ciclo de vida transitório entre formas leveduriformes haplóides e formas filamentosas dicarióticas. A reprodução sexuada envolve mistura de material genético de parentais que formam progênies contendo características genéticas de ambos. A forma sexuada pode ocorrer através de um processo conhecido como frutificação haplóide. As espécies são heterotálicas, com dois tipos sexuais  $MAT\alpha$  e  $MATa$ . Estudos de caracterização fenotípica, incluindo a identificação da espécie, sorotipo e tipo sexual tem grande relevância para a condução de estudos mais aprofundados devido ao estreito relacionamento entre seus aspectos ecológicos variáveis e seu ciclo de desenvolvimento e multiplicação, especialmente para o Norte e Nordeste do Brasil, onde o sorotipo B destaca-se como principal agente de meningite fúngica em hospedeiros normais. Este trabalho utilizou a técnica do CGB para a análise metabólica (identificação da espécie), onde 28 cepas apresentaram resultado positivo, caracterizando *C. gattii* e duas apresentaram resultado negativo, caracterizando *C. neoformans*. Os resultados de sorotipagem, realizados através de teste de aglutinação revelaram 28 cepas do sorotipo B e duas do sorotipo A. A determinação do tipo sexual foi realizada através de técnica de PCR e todas as amostras eram  $MAT\alpha$ .

## ABSTRACT

*Cryptococcus neoformans* was described as human pathogen in 1894. Since then, studies about fungal aspects as biology, taxonomy, ecology and epidemiology have been developed with great importance to medicine and the environment. The fungus was recently classified in two separated species, *C. neoformans* (serotypes A, D and AD) and *C. gattii* (serotypes B and C) each one with well defined genetic and morphological features as well as ecology and epidemiology aspects. *C. neoformans* occurs mainly in immunocompromised hosts, especially those infected by HIV. In the other hand, *C. gattii* infects mainly immunocompetent individuals to all lifetimes. The main factors determining the cryptococcosis pathogenesis have relations with the host defenses state, the size of particle and strain virulence, this last for four main features: the polysaccharide capsule, the melanin production, the mating types (*MAT $\alpha$*  and *MAT $\alpha$* ) and thermotolerance. The fungus has a transitory life cycle between haploid yeast form and dikaryotic filamentous forms. The sexual cycle includes a mixture of genetic parental genes that form progenies containing the genetic characteristics of both. The asexual cycle occurs through a process known as haploid fruiting. The species are heterothallic with two mating types *MAT $\alpha$*  and *MAT $\alpha$* . Phenotypic characterization studies, including the species identification, serotype and mating type have a great importance for conduction of profound studies because of the close relation between the ecological variants features and its development cycle and multiplication, especially in Brazilian regions North and Northeast where serotype B is the most prevalent cause of meningitis in ordinary hosts. This work used the CGB techniques for metabolic analysis (species identification), where 28 strains were positive, characterizing *C. gattii* and two were negative, characterizing *C. neoformans*. The serotyping results, made among agglutination test reveals 28 strains of serotype B and two of serotype A. The mating type was realized by PCR technique and all strains were *MAT $\alpha$* .

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 – ASPECTOS HISTÓRICOS .....	14
1.2 – CARACTERÍSTICAS TAXONÔMICAS .....	15
1.3 – ASPECTOS ECO-EPIDEMIOLÓGICOS .....	18
1.4 – PATOGENIA .....	21
1.5 – VIRULÊNCIA DE <i>C. neoformans</i> E <i>C. gattii</i> .....	22
1.6 – ESTRUTURA GENÉTICA .....	25
1.7 – CICLO DE VIDA .....	27
<b>2 – JUSTIFICATIVA</b> .....	31
<b>3 – OBJETIVOS</b> .....	33
<b>4 – MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
4.1 – AMOSTRAS .....	34
4.2 – CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E SEXUAL .....	36
<b>4.2.1 – Análise Metabólica</b> .....	36
<b>4.2.2 – Sorotipagem</b> .....	38
<b>4.2.3 – Determinação do Tipo Sexuado (marcador molecular)</b> .....	39
4.2.3.1 – Extração do DNA fúngico .....	40
4.2.3.2 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) e Análise Eletroforética .....	41
<b>5 – RESULTADOS</b> .....	42
5.1 – ANÁLISE METABÓLICA .....	42
5.2 – SOROTIPAGEM .....	43
5.3 – DETERMINAÇÃO DO TIPO SEXUADO (MARCADOR MOLECULAR) .....	44
<b>6 – DISCUSSÃO</b> .....	46
<b>7 – CONCLUSÃO</b> .....	49
<b>8 – COMENTÁRIOS</b> .....	50
<b>REFERÊNCIAS DE LITERATURA</b> .....	51

## LISTA D E FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1.1 –</b>	Microscopia óptica de <i>C. neoformans</i> .....	23
<b>Figura 1.2 –</b>	Crescimento de <i>C. neoformans</i> em meio de cultura contendo L-DOPA. ....	24
<b>Figura 1.3 –</b>	Fases do ciclo celular de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> . ....	30
<b>Figura 4.1 –</b>	Teste de CGB. ....	37
<b>Figura 4.2 –</b>	Esquema de uma placa para realização de sorotipagem. ....	38
<b>Tabela 4.1 –</b>	Cepas padrão de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> utilizadas como referência para a caracterização de sorotipo. ....	34
<b>Tabela 4.2 –</b>	Cepas padrão, utilizadas como referência para a caracterização de tipo sexuado (“ <i>mating type</i> ”). ....	34
<b>Tabela 4.3 –</b>	Isolados de fontes clínicas e ambientais utilizadas no estudo. ....	35
<b>Tabela 5.1 –</b>	Resultado das inoculações em meio CGB. ....	42
<b>Tabela 5.2 –</b>	Resultado das reações de aglutinação para determinação do sorotipo. ....	43
<b>Tabela 5.3 –</b>	Resultado da determinação do tipo sexuado. ....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AFLP** – Amplified fragment length polymorphism (polimorfismo de extensão de fragmento amplificado)

**CGB** – Canavanina-glicina-azul de bromotimol.

**DNA** – Ácido Desoxiribonucleico

**GXM** – Glucoro xilomanana

**HIV** – Human Immunodeficiency Vírus (Vírus da imunodeficiência humana).

**NSA** – Niger salt Agar (Agar de sementes de niger).

**PCR** – Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase).

**RAPD** – Randon amplified polymorphic DNA (polimorfismo de DNA amplificado randomicamente, ao acaso)

**RFLP** – Restriction fragment length polymorphism (polimorfismo de extensão de fragmento de restrição).

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 - ASPECTOS HISTÓRICOS

*Cryptococcus neoformans* foi identificado inicialmente como fungo patógeno humano em 1894. A primeira descrição deste agente é atribuída a dois médicos alemães, Otto Busse e Abraham Buschke, que descreveram um caso de lesão de tíbia em mulher de 31 anos de idade. Neste mesmo período, Sanfelice, na Itália, isolou uma levedura capsulada de suco de pêssago e, no ano seguinte demonstrou seu potencial patogênico através infecção experimental em animais de laboratório. Sanfelice denominou o organismo de *Saccharomyces neoformans* por causa da sua tendência para formação de lesões semelhantes a tumores nestes animais experimentais (CASADEVALL & PERFECT,1998).

A primeira metade do século XX foi um período de consolidação para o conhecimento de *C. neoformans* como patógeno de importância na área médica. Em 1931, Freeman publicou uma revisão contendo informações sobre clínica, patologia e microbiologia disponíveis na época. A década de 50 testemunhou vários desenvolvimentos no campo da criptococose. Este período foi caracterizado por uma mudança da descrição clínica para a investigação laboratorial do patógeno sob condições monitoradas. Estes avanços foram de grande relevância para o entendimento da biologia do fungo. Ainda no ano de 1950, Emmons isolou o fungo de solo, especialmente aqueles contaminados com excretas de aves, em particular de pombos, apontando a probabilidade da relação entre habitats de aves, *C neoformans* e criptococose (CASADEVALL & PERFECT,1998).

A importância e a necessidade de estudos sobre a criptococose e seu agente, foram reforçadas em consequência da epidemia mundial de Aids. A micose associada ao HIV tem sido descrita em todo o mundo, com uma proporção direta crescente à da epidemia (CASADEVALL & PERFECT, 1998).

A criptococose se manifesta clinicamente como pneumonia, meningoencefalite e outras formas disseminadas. Está relacionada a transplantes renais, linfomas e outras condições de imunodepressão celular (ROZENBAUM & GONÇALVES, 1994; KWON-CHUNG et al., 1984).

## 1.2 - CARACTERÍSTICAS TAXONÔMICAS

Originalmente, *C. neoformans* foi classificado por Sanfelice (1895) dentro do gênero *Saccharomyces*. Vuillemin, em 1901, transferiu os primeiros isolados (isolado cutâneo de Busse e isolado original de Sanfelice) do gênero *Saccharomyces* para o gênero *Cryptococcus* como *Cryptococcus hominis* e *Cryptococcus neoformans*, respectivamente, por causa de sua incapacidade de fermentar carboidratos e formar ascósporos. Benham mostrou que todos os isolados patogênicos eram da mesma espécie e propôs em 1935, manter a designação *Cryptococcus neoformans* (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992).

Em 1975, Kwon-Chung descreveu o estado perfeito do fungo, após reprodução *in vitro*, demonstrando a existência de dois tipos sexuais: *MAT $\alpha$*  e *MATa*, e incluiu este agente na família *Filobasidiaceae*, gênero *Filobasidiella*. Esta descrição permitiu demonstrar a heterogeneidade entre os isolados de *C. neoformans* através de

cruzamentos de cepas e obtenção de cultivos de *Filobasidiella neoformans*. Os sorotipos A e D do tipo *MAT $\alpha$*  produziram basidiosporos férteis, arredondados, quando cruzados com cepas de *Filobasidiella neoformans* de tipos conjugantes opostos (tipo sexuado *MATa*) enquanto que os sorotipos B e C produziam basidiosporos inférteis nestes mesmos cruzamentos. No entanto, quando cruzados entre si, os sorotipos B e C produziam basidiosporos férteis, porém diferentes em morfologia, de aspecto alongado, baciliforme. Assim, em 1976, Kwon-Chung descreveu *Filobasidiella bacillispora* como teleomorfo dos sorotipos B e C (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992).

Posteriormente, resultados de cruzamentos entre os dois tipos sexuados (sorotipo D tipo sexuado  $\alpha$  X sorotipo B tipo sexuado  $\alpha$ ), exibiram uma mistura entre os basidiosporos de *F. neoformans* e *F. bacillispora*. Baseada nestes achados de cruzamento *in vitro*, Kwon-Chung et al. (1982) propuseram a redução de duas espécies para duas variedades de *C. neoformans*: *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipos A e D) e *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C). Por outro lado, a taxa de re-associação DNA-DNA observada entre as duas variedades (55,2 – 63%) reflete sua divergência genética, o que sugere a presença de espécies distintas (BOEKHOUT et al., 1997; KWON-CHUNG et al., 2002).

Após alguns anos de uma estável classificação taxonômica, dados de análise molecular com diferentes métodos de tipagem de DNA têm demonstrado diferenças genéticas entre isolados grupados dentro de um mesmo sorotipo. Esta situação é bastante complexa pelo fato de *C. neoformans* desenvolver um ciclo sexual com uma conseqüente recombinação genética e ainda algumas cepas serem capazes de auto-frutificar (frutificação haplóide), isto é, reproduzir *Filobasidiella* na ausência do par conjugante (PERFECT & CASADEVALL, 2002)

Estudos da genética mostram que cepas de *C. neoformans* var. *gattii* formam um grupo monofilético claramente distinto do grupo de *C. neoformans* var. *neoformans*. Análises moleculares e genéticas da progênie resultante do cruzamento entre cepas de referência de *C. neoformans* var. *neoformans* com cepas de *C. neoformans* var. *gattii* mostram que não há evidências de recombinação genética entre as duas variedades, indicando que são suficientemente distintas e podem ser reconhecidas em espécies separadas (KWON-CHUNG et al., 2002).

A partir dessas evidências, este trabalho adotará a nova taxonomia proposta, segundo Kwon-Chung (2002) e Art. 14 do ICBN.

Resumo da classificação taxonômica, segundo Kwon-Chung, 2002

Reino: *Fungi*

Filo: *Basidiomycota*

Classe: *Heterobasidiomycetes*

Ordem: *Tremellales*

Família: *Tremellomycetidae*

Gênero: *Filobasidiella*

Espécies:

Teleomorfo: *Filobasidiella neoformans*

Anamorfo: *Cryptococcus neoformans* (sorotipos A e D)

Teleomorfo: *Filobasidiella bacillispora*

Anamorfo: *Cryptococcus gattii* (sorotipos B e C)

### 1.3 - ASPECTOS ECO-EPIDEMIOLÓGICOS

*C. neoformans* tem sido descrito como fungo de distribuição cosmopolita (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; LAZERA et al, 2000; NISHIKAWA et al, 2003). A doença, na maioria dos casos, acomete hospedeiros imunocomprometidos principalmente pelo sorotipo A seguido pelo sorotipo D. A ocorrência do sorotipo D, é mais freqüente em países da Europa Central, porém no Brasil já há relatos significantes de casos isolados confirmados. (NISHIKAWA et al, 2003,CAVALCANTI, 1997; CORRÊA, 2002).

O nicho de *C. neoformans* foi primeiramente relacionado a fezes de pombos (*Columba livia*) (KWON-CHUNG & BENNETT, 1984) e outras aves, como canários e papagaios (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992). O fungo, no entanto, não é causa freqüente de infecção nas aves, provavelmente devido sua elevada temperatura corporal, em torno de 40 – 42°C. O patógeno foi encontrado no papo das aves, mas não no trato intestinal inferior, fato que sugere que as mesmas podem ser portadores transitórios (KWON-CHUNG et al.,1988)

Excretas de pombo são consideradas a principal fonte de contaminação ambiental, podendo-se obter cultivos da forma teleomórfica do fungo, em laboratório, a partir de meios contendo extrato desses excrementos (STAIB, 1981 apud CAVALCANTI, 1997).

No Brasil, o fungo foi isolado na Bahia (SILVA, 1960; AJELLO, 1958), São Paulo (MELO et al., 1987; ROGERS & BENEKER, 1964), Minas Gerais (ROGERS & BENEKER, 1964), Rio de Janeiro (LAZERA, 1989; ROGERS & BENEKER, 1964) e

Rio Grande do Sul (MACHADO et al., 1993). Lazéra (1989), documentou pela primeira vez, a presença de *C. neoformans* em fezes de morcego e, como achado inédito, registrou a presença do fungo em oco de jamelão (*Syzygium jombolana*). Desde então, estudos atuais têm permitido descrever novos habitats, como substratos de vegetais, inclusive relacionados à madeira em decomposição de árvores tropicais (LAZERA et al., 1996, LAZERA et al., 2000; NISHIKAWA, 2003).

A criptococose por *C. gattii* tem sido encontrada em países de clima tropical e subtropical (KWON-CHUNG & BENNETT, 1984). Os hospedeiros acometidos por esta espécie, em sua maioria são imunocompetentes, porém já há relatos da doença em pacientes imunocomprometidos (SEVERO et al., 1986; SHIMIZU et al., 1986). As regiões Norte e Nordeste do Brasil têm apresentado número crescente de casos confirmados da doença por esta espécie, confirmando seu caráter endêmico. (CAVALCANTI, 1997; CORRÊA, 2002).

O nicho deste agente foi primeiramente relacionado com restos de vegetais em decomposição (SWINNE-DESGAIN, 1975), sendo descrito depois por Ellis & Pfeiffer (1990) relacionado a restos vegetais de eucalipto no período de sua floração (*Eucalyptus camaldulensis*). Estudos recentes têm demonstrado que o fungo também está relacionado a outras fontes ambientais, como habitat de morcegos e ocos de árvores tropicais, como a cássia rosa (*Cassia grandis*), oiti (*Moquilea tomentosa*) e ficus (*Ficus sp.*) (LAZERA et al., 2000, NISHIKAWA et al., 2003), sugerindo que as condições climáticas e geográficas podem influenciar o crescimento de uma espécie ou sorotipo em detrimento de outro, ou ainda de sorotipos distintos em uma mesma fonte, facilitando a possibilidade de infecção humana por sorotipos distintos ou espécies distintas (LAZERA, 2000; NISHIKAWA, 2003).

Uma epidemia de criptococose, com manifestações pulmonares e comprometimento do sistema nervoso central, foi descrita na Ilha de Vancouver (Canadá) (FRASER et al, 2003; HOANG et al, 2004 KIDD et al, 2004) e a maioria dos casos confirmados era por *C. gattii*. A identificação da colonização em larga escala do ambiente por esta espécie, ocorrendo em zona de clima temperado, indica uma forte mudança na distribuição ecológica do fungo (KIDD et al, 2004), suscitando uma nova discussão sobre a restrição do habitat de *C. gattii* a regiões de clima tropical e subtropical (FRASER et al, 2003).

Fischer e cols. (1993), e Mitchell e cols. (1995), concluíram que *C. gattii*, na Austrália, é agente de criptococose em pacientes imunocompetentes, residentes da zona rural ou periurbana e que a doença provoca com freqüência, formação de lesões de massa intracerebral e pulmonar, formas clínicas mais graves e elevados títulos de antígenos criptocócicos, quando comparada com criptococose por *C. neoformans*. Bastide & Mallie (1986), consideram a criptococose por *C. gattii* mais resistente ao tratamento e mais implicada em seqüelas neurológicas, como demonstrado em modelos murinos em estudos relacionados à cronicidade da doença.

Os pacientes com criptococose por *C. gattii* requerem terapia antifúngica mais prolongada e intervenção neurocirúrgica, com maior freqüência do que os pacientes infectados por *C. neoformans* (KWON-CHUNG et al., 1994).

#### 1.4 – PATOGENIA

A patogênese da criptococose, como nas demais infecções, pode ser relacionada a três principais fatores: a situação de defesa do hospedeiro, o tamanho do inóculo e a virulência da cepa (MITCHELL & PERFECT, 1995).

Um conceito fundamental para a patogênese da criptococose é a suprema importância da integridade de defesa do hospedeiro, pois considerando-se a condição ubíqua do fungo em natureza e a baixa prevalência de infecção sintomática, torna-se evidente que a incidência de exposição ao patógeno excede amplamente a incidência de doença (MITCHELL & PERFECT, 1995). Anteriormente à epidemia de Aids, a criptococose ocorria tanto em homens como em animais, em torno do mundo (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992). No entanto, uma taxa de crescimento da doença, sem precedentes tem sido observada desde o início dos anos 80, apontando principalmente a Aids como fator predisponente.

A criptococose é a quarta causa mais reconhecida de infecção grave entre pacientes com Aids. Por outro lado, o fator predisponente mais comum para a criptococose em pacientes sem Aids é o uso prolongado de corticosteróides. Sarcoidose, linfomas e outras condições de imunocomprometimento celular também estão ligadas ao aparecimento da doença (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992). No Brasil, em pacientes imunocompetentes a criptococose vem sendo descrita como doença primária, especialmente em crianças e adultos jovens (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; CAVALCANTI, 1997; CORRÊA, 2001; MARTINS, 2003).

Cepas de *C. neoformans* e *C. gattii*, em natureza podem apresentar diferenças no grau de virulência e no estabelecimento de infecção sintomática no hospedeiro

imunocompetente ou imunocomprometido, dependendo do tamanho da célula leveduriforme inalada (MITCHEL & PERFECT, 1995). Estudos experimentais sugerem que os basidiósporos podem ser 100 vezes mais infectantes que células leveduriformes vegetativas, uma vez que eles apresentam tamanho ótimo (1 – 2 $\mu$ ) para a inalação e deposição alveolar em relação ao tamanho destas (4 – 10 $\mu$ ) (HULL & HEITMAN, 2002).

### 1.5 – VIRULÊNCIA DE *C. neoformans* e *C. gattii*

A virulência é uma característica microbiana que é expressa somente no hospedeiro susceptível (STEENBERGEN & CASADEVALL, 2003).

Os principais fatores que determinam o grau de virulência da cepa são a cápsula polissacarídica, a produção de melanina, a diferença de tipos sexuais (*MAT $\alpha$*  e *MATa*), e a termotolerância.

A cápsula polissacarídica distingue *C. neoformans* e *C. gattii* de outros fungos patogênicos pela sua estrutura própria. Seu tamanho pode variar, tanto em amostras *in vitro*, como em amostras *in vivo*. (DOERING, 2000; MITCHELL & PERFECT, 1995). É composta por pelo menos três componentes: manoproteína, galactoxilomanana e a glucuroxilomanana (GXM), sendo este último o principal polissacáride, ocupando cerca de 90% da massa total da cápsula (DOERING, 2000).

A cápsula tem sido caracterizada como um fator importante de virulência, a partir de estudos de genética. Pelo menos quatro genes capsulares individuais foram identificados e caracterizados: *CAP 64*, *CAP60*, *CAP59* e *CAP10*, cada um exercendo

papel fundamental para a virulência em modelos murinos (STEENBERGEN & CASADEVALL, 2003). Ela inibe a ingestão de células leveduriformes pelos fagócitos na ausência de opsoninas (STEENBERGEN & CASADEVALL, 2003), protege a levedura de desidratação em condições ambientais extremas (HOGAN et al.,1996), ativa a via alternativa do complemento, desenvolvendo assim um importante papel nas injúrias ao hospedeiro (DOERING, 2000; STEENBERGEN & CASADEVALL, 2003).

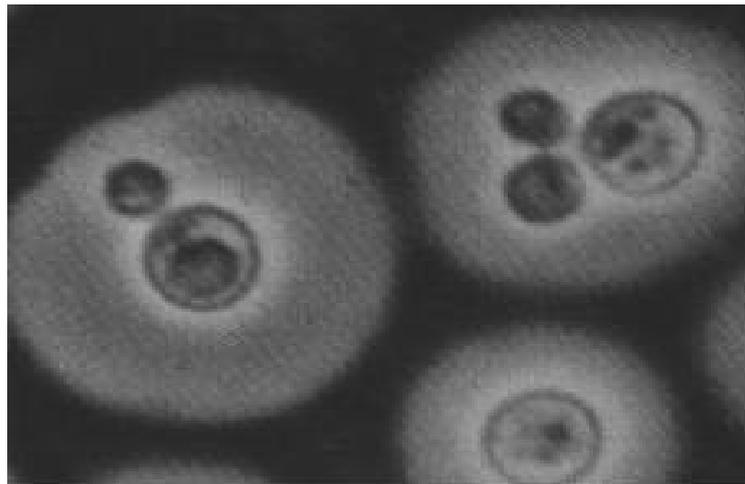


Figura 1.1 – Microscopia óptica de *C. neoformans*, delineando a cápsula polissacarídica pela “Tinta da China”. O círculo interno representa a célula fúngica, com um largo círculo externo determinando a cápsula. STEENBERGEN & CASADEVALL,2003.

Melanina é uma molécula pigmentar negativamente carregada, produzida por uma lacase através da polimerização oxidativa de componentes fenólicos contendo hidroxyl ou grupos di-amina como a L-DOPA, dopamina, norepinefrina e epinefrina (HOGAN et al.,1996; STEENBERGEN & CASADEVALL,2003). Esta característica tem sido muito utilizada para o isolamento e para a identificação em laboratórios clínicos. Cultivos de *C. neoformans* e *C. gattii* realizados em meio contendo esses precursores são geralmente marron escuro.

A melanina também tem sido estabelecida como um importante fator de virulência, uma vez que células melanizadas são significativamente menos susceptíveis aos efeitos oxidantes do oxigênio e nitrogênio. Estudos *in vitro* com *C. neoformans* e macrófagos, demonstraram que células melanizadas foram mais resistentes à fagocitose e morte celular, causadas por células efectoras. A resistência criptocócica aos antifúngicos, como caspofungina e anfotericina B, e peptídios microbiocidas também se deve à presença de melanina. Estas observações sugerem que a melanina aumenta a virulência, reduzindo a susceptibilidade de *C. neoformans* aos mecanismos de defesa do hospedeiro, podendo influenciar no sucesso da terapia. (STEENBERGEN & CASADEVALL,2003).

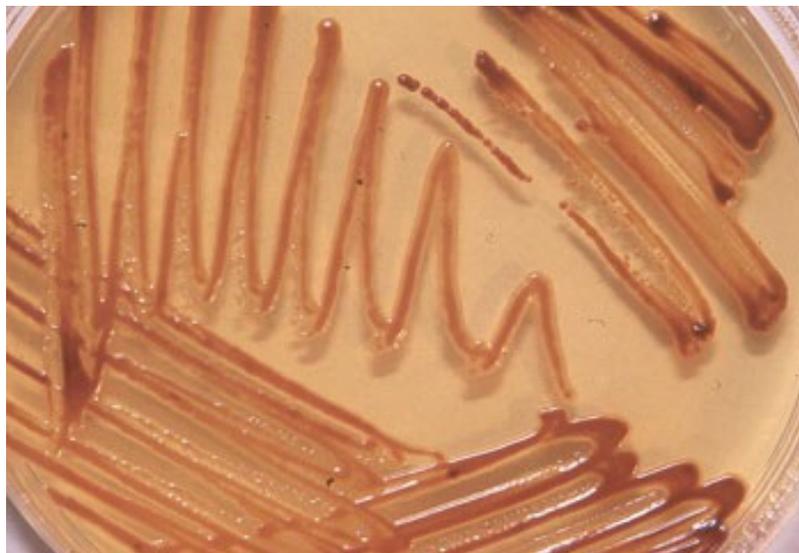


Figura 1.2 – Crescimento de *C. neoformans* em meio de cultura contendo L-DOPA. O fungo forma colônias marrons, resultado da melanização. STEENBERGEN & CASADEVALL,2003.

*C. neoformans* e *C. gattii* existem em dois tipos sexuais:  $MAT\alpha$  e  $MATa$ . Cepas  $MAT\alpha$  tanto de isolados clínicos como de isolados ambientais tem demonstrado ser 30 a 40 vezes mais prevalentes do que cepas  $MATa$ .

Quando cepas congênicas variantes contendo apenas um tipo sexuado foram inoculadas em camundongos, foi concluído que as cepas *MAT $\alpha$*  foram significativamente mais virulentas do que as cepas *MATa* (KWON-CHUNG & BENNETT, 1978; HOGAN et al.,1996; COGLIATI et al., 2001; STEENBERGEN & CASADEVALL,2003).

Um atributo essencial e óbvio para a virulência de *C. neoformans* e *C. gattii* é a capacidade de crescer em temperaturas fisiológicas, ou seja, sua termotolerância. Os fungos são em sua maioria ubíquos e mais de vinte mil espécies têm sido descritas. No entanto, menos do que 0,01% são capazes de causar doenças em humanos. Este fenômeno é amplamente causado pela incapacidade da maioria dos fungos do ambiente, crescer a 37°C (STEENBERGEN & CASADEVALL, 2003).

## 1.6 – ESTRUTURA GENÉTICA

Os cromossomos fúngicos são pequenos e altamente condensados. A contagem e a visualização são difíceis através de métodos de microscopia convencional com coloração de células, uma vez que a membrana nuclear persiste durante a maior parte do ciclo celular (TAKEO, 1993; DEACON, 1997). Estudos moleculares recentes, especialmente aqueles utilizando eletroforese de campo pulsado permitiram separar macromoléculas, facilitando os estudos cromossomiais. A partir destes estudos foi possível constatar que *C. neoformans* possui um genoma entre 18 e 24Mb distribuídos em aproximadamente 12 cromossomos (HULL & HEITMAN, 2002). O número de cromossomos de *C. gattii* varia entre nove e 14, tendo como número mais freqüente 13 cromossomos, onde o menor apresenta-se com

média de 500 Kb e o maior com 2,2 Mb (WICKES, MOORE & KWON-CHUNG, 1994; BOEKHOUT et al., 1997).

Três genes têm sido descritos como essenciais para sobrevivência de *C. neoformans* e *C. gattii*. O gene N-myristoyl transferase *NMT1*, ligado a sensibilidade de temperatura, o gene *TOP1*, isolado da topoisomerase I, e o gene *FKS1*, gene essencial ligado à capacidade de resistência a antifúngicos, especialmente a atividade da caspofungina (HULL & HEITMAN, 2002).

Um dos mais importantes e recentes desenvolvimentos para o estudo da genética de microrganismos e a sua patogênese é a aplicação de tecnologias genômicas e sua integração com o aprimoramento da biologia genética e molecular. Nos últimos anos, muitos estudos foram desenvolvidos, buscando aplicar estas técnicas aos aspectos epidemiológicos de *C. neoformans* e *C. gattii*.

Meyer (1999) descreveu quatro grandes grupos moleculares (VNI e VNII, sorotipo A; VNIII, sorotipo AD e VNIV, sorotipo D) para isolados globais de *C. neoformans* var. *neoformans*, através de técnicas de PCR, utilizando iniciadores específicos de DNA de minisatélites ou microsátélites e análises de polimorfismo de DNA amplificado randomicamente ao acaso (RAPD) usando duas combinações de iniciadores randômicos. Os resultados mostraram alto grau de homogeneidade genética, para os isolados das diferentes partes do mundo. Mais tarde, em 2003, outro estudo de polimorfismo de DNA utilizando reação de PCR com o iniciador *M13* bem como do gene *URA5* submetido à técnica de dupla digestão enzimática seguida de análise de polimorfismo de extensão de fragmento de restrição (RFLP) permitiu análise de ampla série de isolados clínicos e ambientais e discriminou outros quatro tipos

moleculares, para *C. neoformans* var. *gattii*, (VGI, VGII, VGIII, VGIV correspondentes aos sorotipos B ou C) além daqueles descritos anteriormente. (MEYER et al. 2003).

No Brasil, estudo do polimorfismo de DNA, com a técnica de polimorfismo de extensão de fragmento amplificado (AFLP), que permite identificar três genótipos para *C. neoformans* (G1, G2 e G3) e três outros para *C. gattii* (G4, G5 e G6) revelou aspectos eco-epidemiológicos relacionados ao continente americano (TRILLES, et al, 2003) e marcante diversidade genotípica de *C. neoformans* no Brasil, com predomínio do genótipo G6 entre os isolados da espécie *gattii*, além de sua similaridade com o tipo molecular VGII de Meyer (MEYER et al. 2003).

## 1.7 – CICLO DE VIDA

O ciclo de vida de *C. gattii*, bem como o de *C. neoformans*, é caracterizado por uma transição dimórfica entre uma forma em levedura haplóide e uma forma filamentosa dicariótica (LENGELER et al. 2001). A reprodução sexual envolve uma mistura de material genético de dois parentais que formam uma progênie contendo genes de ambos os parentais (NIELSEN et al., 2003).

O sistema de ciclo sexuado de *C. gattii* é controlado por um locus com dois alelos funcionais, altamente complexo. Contém uma variedade de genes essenciais para a morfogênese e determinação do tipo sexual, bem como pode ser identificado como um fator de virulência em potencial (YAN et al., 2002). Ambas as espécies, *C. neoformans* e *C. gattii* são heterotáticas com dois tipos sexuados, *MATa* e *MAT $\alpha$*  (YAN et al., 2002; COGLIATI et al., 2001).

O cruzamento sexuado ocorre quando células *MAT<sub>a</sub>* e *MAT<sub>α</sub>* em estado de carência nutricional e em resposta a feromônios conjugantes (HULL & HEITMAN, 2002) entram em contato físico e fundem-se adquirindo estado diplóide, diferenciando-se em hifas dicarióticas com formação de grampos de conexão e basídios terminais onde ocorrem a meiose e a esporulação. (HULL & HEITMAN, 2002; KELLER et al., 2003; TSCHARKE et al., 2003) Os esporos haplóides de cada tipo sexuado formam cadeias na superfície basidial por sucessivas divisões mitóticas. Uma vez formadas estas cadeias, os basidiósporos individuais germinam e formam leveduras brotantes haplóides, completando o ciclo celular (KWON-CHUNG, 1975, 1976; KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; KELLER et al., 2003; TSCHARKE et al., 2003).

Células *MAT<sub>α</sub>* podem também responder às limitações de disponibilidade de nitrogênio e água e sinais do feromônio *Mfa*, diferenciarem-se por um processo conhecido como frutificação haplóide, que envolve filamentação e esporulação (HULL & HEITMAN, 2002; TSCHARKE et al., 2003). Esta fase envolve uma diferenciação filamentosa onde na ausência do outro tipo sexuado complementar e sob condições críticas de nitrogênio, células leveduriformes de um só tipo sexuado, haplóides produzem hifas septadas, monocarióticas, com grampos de conexão separados, apresentando basídios terminais e basidiosporos (HULL & HEITMAN, 2002). Tscharke e cols. (2003), afirmaram em trabalho recente, que o fenômeno de frutificação haplóide não está relacionado a um “*mating type*” específico, demonstrando que cepas *MAT<sub>a</sub>* são também capazes de frutificar sob condições específicas, bem como, demonstraram que não há nenhuma associação genética entre tipo sexuado e frutificação haplóide.

A frutificação haplóide é possivelmente controlada pelo gene *STE12a/α* bem como por um fator desconhecido não ligado ao locus do “*mating type*” (TSCHARKE et al, 2003).

A fase diplóide do fungo é normalmente transitória (HULL & HEITMAN, 2002), portanto a maioria dos isolados clínicos e ambientais têm sido classificados como haplóides. Apesar disso, raros isolados diplóides tem sido relatados, baseados em ensaios de determinação do conteúdo de DNA celular (TAKEO, 1993; TANAKA, 1996; LENGELER ET AL., 2002).

A importância do estágio sexuado dos fungos patogênicos em natureza ou durante a patogênese ainda não está bem entendido, porém tem despertado atenção especial em virtude de razões importantes como: 1) células *MATα* têm se mostrado significativamente mais virulentas do que células *MATa*, tanto em modelos experimentais de infecção (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992) como em amostras clínicas e ambientais (COGLIATI et al., 2001; TSCHARKE et al., 2003). 2). A relação de frequência de ocorrência *MATα* e *MAT a*, mostra-se em torno de 40:1, tanto em isolados de amostras clínicas como de amostras ambientais (KWON-CHUNG & BENNETT, 1978), embora índices de 1:1 sejam rotineiramente obtidas em cruzamentos *in vitro*, em laboratório (TSCHARKE et al., 2003). Isto sugere que em natureza haja fatores que levam ao predomínio de *MATα*, com maior resistência e mais capacidade de adaptação e virulência deste tipo sexuado.

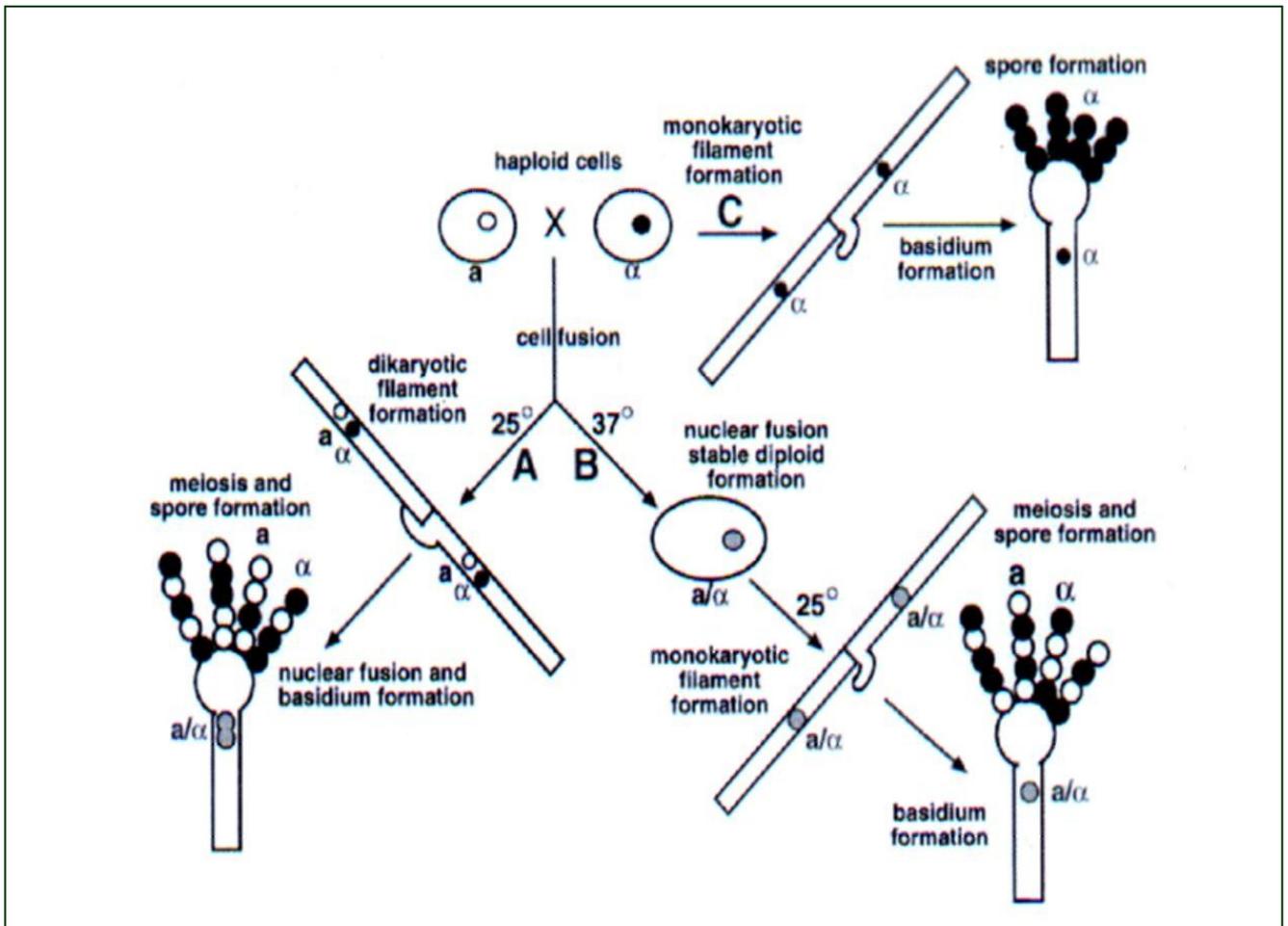


Figura 1.3 – Fases do ciclo celular de *C. neoformans* e *C. gattii*. A – ciclo sexuado envolvendo duas células haplóides de matings diferentes. B – filimentação diplóide envolvendo células de matings diferentes mantidos em 37°C. C – frutificação haplóide. Figura de Hull & Heitman, 2002.

## 2 – JUSTIFICATIVA

Estudos epidemiológicos recentes têm demonstrado que a criptococose pela espécie *C. gattii*, no Brasil, vem aumentando em número de casos confirmados através de diagnóstico clínico e melhoramento das condições de diagnóstico laboratorial (CAVALCANTI, 1997; CORRÊA, 2002). Corrêa e cols. (1999), descreveram 19 casos de meningoencefalite criptocócica infantil no Estado do Pará, tendo como agente etiológico isolado em todos os casos *C. gattii*. Estes achados contrastam com dados existentes na literatura, que descrevem a criptococose infantil como rara, mesmo no grupo de imunodeprimidos (EMANUEL et al., 1961 apud CORRÊA, 2002).

Martins (2003) em estudo de caracterização de isolados clínicos e levantamento epidemiológico de meningoencefalite criptocócica na região do Meio-Norte, constatou que o número de casos da doença é significativo, demonstrando que a micose causada por *C. gattii* ocorre também em indivíduos HIV negativos, atingindo crianças e jovens com elevada mortalidade. A ecologia do fungo, sua preferência por regiões geográficas específicas e nichos ecológicos variados (NISHIKAWA et al., 2003), tem favorecido o aumento do número de casos, em velocidade crescente, conferindo características de problema endêmico para as regiões Norte e Nordeste.

Dados da literatura apresentam número de estudos de perfil fenotípico, caracterização sexual de *C. neoformans*, que avaliam, na maioria das vezes, cepas dos sorotipos A e D, bem caracterizadas (TAKEO., 1993; OHKUSU et al., 2002) e, quando híbridas, (sorotipo AD) apresentando-se como diplóides ou ainda aneuplóides (COGLIATI et al., 2001 LENGELER et al., 2001). Segundo Hull & Heitman (2002) a relevância do estado diplóide em natureza é uma característica que recentemente foi

descoberta e estudada. Estas cepas AD parecem ser originárias de uma fusão entre uma cepa sorotipo A e uma cepa sorotipo D, seja por processo recombinante ou por hibridização (CASADEVALL & PERFECT, 1998).

Estudos sobre caracterização fenotípica e sexuada relacionados a *C. gattii* ainda estão sendo lentamente desenvolvidos, porém devem ser considerados de interesse para nosso país e particularmente para as regiões Norte e Nordeste, onde o sorotipo B destaca-se como o principal agente de meningite fúngica em hospedeiros normais (MARTINS, 2003, CORRÊA, 1999; 2002, CAVALCANTI, 1997) É de interesse também, o conhecimento específico dos aspectos ecológicos variáveis do fungo (OHKUSU et al., 2002) em relação com seu ciclo de desenvolvimento e multiplicação. Estes são aspectos que ainda necessitam de estudos aprofundados.

Trabalhos desta natureza em *C. neoformans* têm apresentado sempre resultados satisfatórios para a caracterização dos níveis de virulência das cepas infectantes (BOEKHOUT et al., 2001). A espécie *C. gattii*, no entanto, ainda apresenta poucos relatos, ou mesmo nenhum desses perfis descritos na literatura, justificando assim, o foco do desenvolvimento deste trabalho.

### **3 – OBJETIVOS**

#### **3.1- GERAL**

Caracterização fenotípica de isolados de *Cryptococcus gattii* de origem clínica e ambiental do Brasil.

#### **3.2- ESPECÍFICO**

a) Identificar o perfil fenotípico de isolados de *Cryptococcus gattii* quanto a variedade, sorotipo e tipo sexuado.

## 4 – MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1- AMOSTRAS

Trinta isolados de fontes clínicas e ambientais de *Cryptococcus gattii* foram utilizadas neste estudo, além de oito cepas padrão, utilizadas como referência para caracterização de sorotipo e tipo sexuado. As amostras estão relacionadas nas tabelas 4.1, 4.2 e 4.3.

Tab. 4.1 – Cepas padrão de sorotipos de *C. neoformans* e *C. gattii*, utilizadas como referência para a caracterização de sorotipo. LMM corresponde a Laboratório de Micologia Médica (Instituto de Pesquisa Clínica Hospital Evandro Chagas – Fiocruz)

LMM	Sorotipo	Nome original	Origem	País
739	A	JAS-MS	Clínica	Brasil
744	A	UAC1-MS	Clínica	Brasil
439	B	ATCC 32.269	Clínica	Zaire
610	C	ATCC 24.066	Clínica	Sem o dado
695	D	ATCC 32.045	Ambiental	Itália
796	AD	ZAPF (WM 628)	Clínica	Austrália

Tab. 4.2 – Cepas padrão, utilizadas como referência para a caracterização de tipo sexuado (“*mating type*”). LMM corresponde a Laboratório de Micologia Médica (Instituto de Pesquisa Clínica Hospital Evandro Chagas – Fiocruz); CGB corresponde a Canavanina Glicina Azul de Bromotimol; Mat corresponde a “*mating type*”.

LMM	CGB	Sorotipo	Nome original	Mat	Origem	País
876	N	D	Caridade 19-1	a	Ambiental	Brasil
878	N	A	Caridade 23-4	alfa	Ambiental	Brasil

Tab. 4.3 – Isolados de fontes clínicas e ambientais utilizados no estudo. LMM corresponde a Laboratório de Micologia Médica (Instituto de Pesquisa Clínica Hospital Evandro Chagas – Fiocruz); HIV corresponde a Human Immunodeficiency Virus.

<b>LMM</b>	<b>HIV</b>	<b>Origem</b>	<b>Estado de Origem</b>
23	Negativo	Clínica	PI
201	Não informado	Clínica	RJ
293	Negativo	Clínica	RJ
330	Negativo	Clínica	RJ
362	Não informado	Clínica	RJ
414	-	Ambiental	PI
447-12	-	Ambiental	PI
484-3	-	Ambiental	PI
484-2	-	Ambiental	PI
484-1	-	Ambiental	PI
498	-	Ambiental	PI
562-11	-	Ambiental	PI
562-10	-	Ambiental	PI
562-9	-	Ambiental	PI
561-7	-	Ambiental	PI
562-8	-	Ambiental	PI
562-7	-	Ambiental	PI
561-1	-	Ambiental	PI
655	-	Ambiental	PI
724	Negativo	Clínica	AM
727	-	Ambiental	PI
817	Não informado	Clínica	BA
818	Não informado	Clínica	BA
1030	Negativo	Clínica	AM
1035	Negativo	Clínica	AM
1167	Não informado	Clínica	PA
1168	Não informado	Clínica	PA
1169	Não informado	Clínica	PA
1170	Não informado	Clínica	PA
1171	Negativo	Clínica	PA

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Micologia Ambiental, Serviço de Micologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, no estado do Rio de Janeiro, nos períodos de agosto a dezembro de 2003.

Os isolados foram provenientes de diferentes localidades do Brasil, incluindo isolados das regiões Norte e Nordeste

## 4.2- CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E SEXUAL

### 4.2.1- Análise metabólica

O *C. gattii* hidrolisa a glicina e é resistente à L-Canavanina. Então, como resultado da utilização da glicina como fonte de carbono, a massa fúngica cresce em meio de Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol (CGB), elevando o pH de 5.8 para 7.0, fazendo com que o azul de bromotimol torne o meio azul cobalto, conferindo resultado positivo ao teste. O *C. neoformans* não utiliza a glicina e é sensível à L-Canavanina, não sendo capaz de crescer no meio CGB, mantendo a cor do meio inalterada e conferindo resultado negativo ao teste.

O procedimento foi desenvolvido, semeando-se um pequeno inóculo no centro do tubo de ensaio, contendo o meio de CGB. A amostra testada devia estar pura, para evitar testes falso-positivos. Cada isolado de *Cryptococcus* foi previamente semeado na forma de suspensão em H<sub>2</sub>O estéril em meio de sementes de níger com cloranfenicol (NSA), observadas por 3 a 5 dias para obtenção de colônias marrons típicas e verificação de pureza dos isolados. De cada isolado analisado foram obtidas 3 colônias fenol-oxidase positivo, bem individualizadas no meio, e cada uma foi

analisada no meio CGB. Isto é foram feitos 3 testes CGB para cada dos 30 isolados analisados.

As observações do material inoculado no meio CGB foram procedidas 48 horas e 5 dias após a inoculação, respectivamente, a olho nu. Como resultado da primeira leitura, os tubos contendo o meio CGB deviam apresentar a cor azul cobalto como resultado da hidrólise da glicina e a conseqüente elevação do pH de 5,8 para 7,0, no caso de *C. gattii*, enquanto os *C. neoformans* não deverão sofrer nenhuma alteração na cor do meio (KWON-CHUNG, 1982).

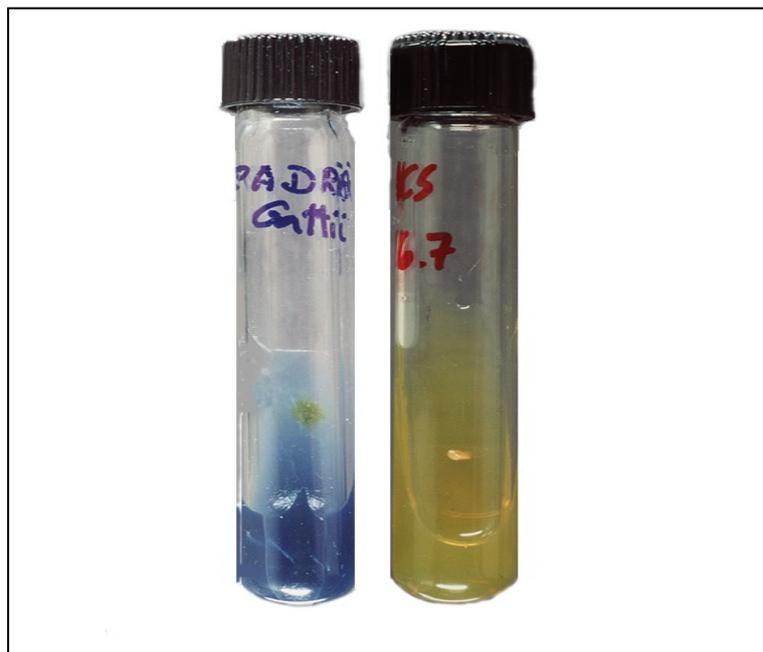


Fig. 4.1 – Teste de CGB.

#### 4.2.2 – Sorotipagem

Um teste comercial, de aglutinação de partículas de látex sensibilizadas (Crypto Check latron RM – Laboratórios latron, Tokyo, Japão) foi utilizado para identificar o sorotipo de todas as cepas. Os isolados foram cultivados em ágar YMA (yeast extract-malt extract-agar; Difco) a 25°C por 48 horas. Após este período, a cultura foi ressuspensa em solução salina estéril e, em uma placa de vidro para aglutinação foram depositados 50µl desta suspensão em seis concavidades, onde foi adicionada uma gota de cada fator correspondente (F1, F5, F6, F7 e F8). A placa foi agitada por 2 minutos e após este período a leitura foi procedida por observação direta. A aglutinação indica positividade e os padrões são os seguintes:

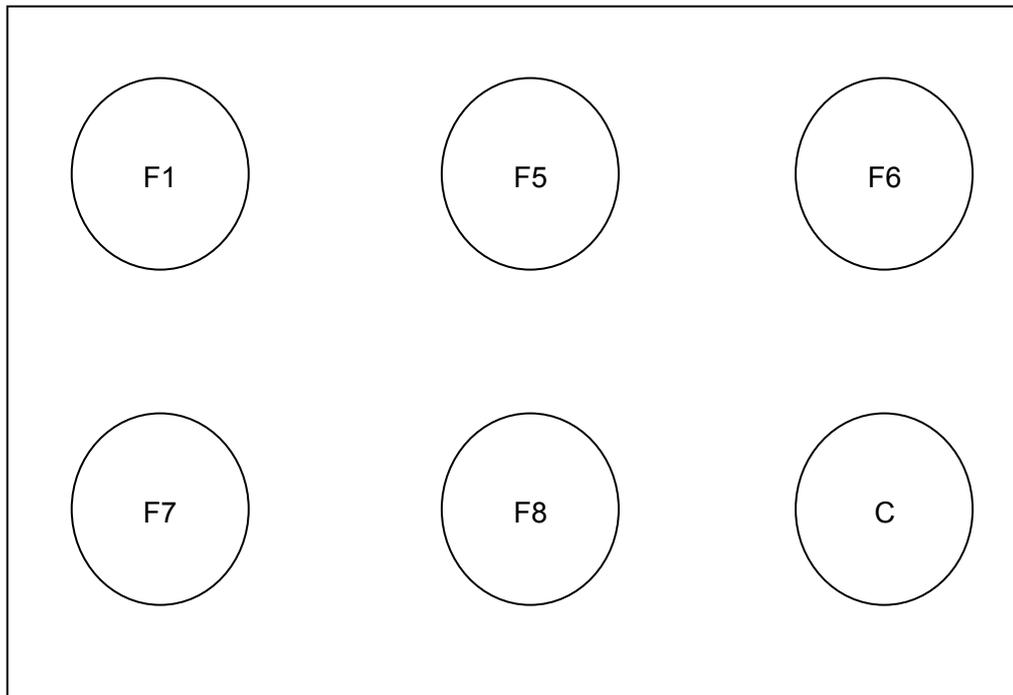


Fig. 4.2 Esquema de uma placa para realização da sorotipagem. Os círculos F1, F5, F6, F7 e F8 correspondem aos antígenos para sorotipo e C corresponde ao controle.

**F1**, indica o gênero *Cryptococcus*

**F5**, indica sorotipo B, espécie *C. gattii*

**F6**, indica sorotipo C, espécie *C. gattii*

**F7**, indica sorotipo A, espécie *C. neoformans*

**F8**, indica sorotipo D, espécie *C. neoformans*

**F7 + F8**, indica sorotipo híbrido AD, espécie *C. neoformans*

**C** indica o controle do teste

#### **4.2.3 – Determinação do tipo sexuado (marcador molecular)**

A determinação do tipo sexuado em fungos é controlada pelas informações codificadas por um *MAT* locus. Esta região do genoma é especial, uma vez que cromossomos homólogos contêm informações não-homólogas que especificam diferenças genéticas entre tipos celulares (HULL & HEITMAN, 2002).

Em basidiomicetos, há dois tipos distintos de *MAT* loci: um codifica os feromônios, que são lipopeptídios e seus receptores, enquanto outro codifica homeodomínios reguladores transcricionais. Ambos *MAT* loci são necessários para a especificidade do tipo celular (HULL & HEITMAN, 2002; CHATURVEDI et al., 2002).

Um teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi reproduzido no Laboratório de Micologia Ambiental do IPEC/FIOCRUZ, previamente desenvolvido por Chaturvedi (2000), para amplificar uma seqüência-alvo do DNA celular fúngico, específica para o tipo sexuado, seguido de corrida eletroforética em gel de agarose (CHATURVEDI, 2000).

#### 4.2.3.1- Extração do DNA fúngico

Os isolados foram cultivados em meio de Sabouraud 2% a 25°C por 48 horas para crescimento. Após esse período, a massa fúngica formada foi colocada em solução de lise, homogeneizada e incubada em banho-maria a 30°C por duas horas e centrifugada por cinco minutos a 6500 rpm. Ao precipitado foi acrescentado 0,5ml de TES e 0,5ml de SDS 10% (duodecil sulfato de sódio) e incubado a 65°C por 30 minutos. Duzentos microlitros de acetato de sódio 3M foram acrescentados a essa solução e Rnase em concentração de 10µg/ml, sendo então incubada a 37°C por 30 minutos.

A solução foi centrifugada por 10 minutos a 6500 rpm a 4°C. Foi acrescentado ao sobrenadante igual volume de fenol/clorofórmio (1:1), mantido a 4°C durante a noite sob rotação lenta. Esta etapa correspondeu à primeira lavagem. Após nova centrifugação por 10 minutos a 4°C a 6500 rpm, uma segunda lavagem foi realizada com fenol/clorofórmio, sendo a incubação feita em rotação lenta por 1 hora a 4°C. O sobrenadante foi então recuperado após centrifugação a 6500 rpm por 10 minutos a 4°C, acrescido de acetato de sódio a 3M (1/10 do volume do sobrenadante obtido) e de etanol 100% a 4°C (duas vezes o volume do sobrenadante obtido). A solução foi mantida a -20°C durante a noite e centrifugada a 9000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com etanol 70%, sendo então centrifugado a 9000 rpm por 10 minutos a 4°C. Este sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspendido em água deionizada.

#### 4.2.3.2 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) e Análise eletroforética.

A presença e a integridade do DNA extraído foram testadas através de corrida de eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão de corrida TAE. A concentração do DNA extraído foi verificada pela medição da absorbância a 260nm em espectrofotômetro e o DNA extraído foi diluído em água MilliQ estéril para concentração final de 40ng/ $\mu$ l e estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Os iniciadores utilizados para identificar “*mating type*”  $\alpha$  foram: 5'-CTTCACTGCCATCTTCACCA-3' e 5'-GACACAAAGGGTCATGCCA-3' e para identificar “*mating type*”  $a$  foram: 5'-CGCCTTCACTGCTACCTTCT-3' e 5'-AACGCAAGAGTAAGTCGGGC-3'. Este conjunto de iniciadores corresponde ao gene do feromônio relacionado ao tipo sexuado (CHATURVEDI et al., 2000)

A amplificação foi feita, utilizando-se volumes de 25 $\mu$ l, contendo 100ng de DNA, 2,5 $\mu$ l de tampão Taq 10X, 0,2mM de dNTP, 1U de Taq Polimerase, 2,5 $\mu$ l do primer a 10pmol/ $\mu$ l. A reação de PCR foi realizada com desnaturamento inicial, durante 5 minutos a  $94^{\circ}\text{C}$ , 40 ciclos de 20 segundos de desnaturamento a  $93^{\circ}\text{C}$ , 60 segundos de anelamento a  $50^{\circ}\text{C}$  e 20 segundos de extensão do primer a  $72^{\circ}\text{C}$ .

## 5 – RESULTADOS

### 5.1 – ANÁLISE METABÓLICA

Todas as 30 cepas foram semeadas em meio CGB e as observações procedidas 48 horas e 5 dias após a inoculação. Vinte e oito (93,3%) apresentaram resultado positivo e duas (6,7%) apresentaram resultado negativo. Os resultados estão demonstrados na tabela 5.1.

Tab. 5.1 – Resultado das inoculações em meio CGB. LMM corresponde a Laboratório de Micologia Médica (Instituto de Pesquisa Clínica Hospital Evandro Chagas – Fiocruz); CGB corresponde a Canavanina Glicina Azul de Bromotimol.

<b>LMM</b>	<b>Origem</b>	<b>CGB</b>
23	Clínica	Positivo
201	Clínica	Positivo
293	Clínica	Positivo
330	Clínica	Positivo
362	Clínica	Positivo
414	Ambiental	Positivo
447-12	Ambiental	Positivo
484-3	Ambiental	Positivo
484-2	Ambiental	Positivo
484-1	Ambiental	Positivo
498	Ambiental	Positivo
562-11	Ambiental	Positivo
562-10	Ambiental	Positivo
562-9	Ambiental	Positivo
561-7	Ambiental	Positivo
562-8	Ambiental	Positivo
562-7	Ambiental	Positivo
561-1	Ambiental	Positivo
655	Ambiental	Positivo
724	Clínica	Positivo
727	Ambiental	Positivo
817	Clínica	Positivo

818	Clínica	Positivo
1030	Clínica	Positivo
1035	Clínica	Positivo
<b>1167</b>	Clínica	<b>Negativo</b>
<b>1168</b>	Clínica	<b>Negativo</b>
1169	Clínica	Positivo
1170	Clínica	Positivo
1171	Clínica	Positivo

## 5.2 – SOROTIPAGEM

As cepas foram submetidas ao teste de aglutinação e as leituras foram efetuadas de acordo com o padrão de aglutinação. Foram utilizadas cepas padrão para a caracterização dos resultados, que estão demonstrados na tabela 5.2

Tab. 5.2 – Resultado das reações de aglutinação para determinação do sorotipo. LMM corresponde a Laboratório de Micologia Médica (Instituto de Pesquisa Clínica Hospital Evandro Chagas – Fiocruz).

<b>LMM</b>	<b>Origem</b>	<b>Sorotipo</b>
23	Clínica	B
201	Clínica	B
293	Clínica	B
330	Clínica	B
362	Clínica	B
414	Ambiental	B
447-12	Ambiental	B
484-3	Ambiental	B
484-2	Ambiental	B
484-1	Ambiental	B
498	Ambiental	B
562-11	Ambiental	B
562-10	Ambiental	B
562-9	Ambiental	B

561-7	Ambiental	B
562-8	Ambiental	B
562-7	Ambiental	B
561-1	Ambiental	B
655	Ambiental	B
724	Clínica	B
727	Ambiental	B
817	Clínica	B
818	Clínica	B
1030	Clínica	B
1035	Clínica	B
<b>1167</b>	Clínica	<b>A</b>
<b>1168</b>	Clínica	<b>A</b>
1169	Clínica	B
1170	Clínica	B
1171	Clínica	B

### 5.3 – DETERMINAÇÃO DO TIPO SEXUADO (MARCADOR MOLECULAR)

Todas amostras foram submetidas à extração do material genético, seguida de realização de PCR e análise eletroforética. Os resultados estão representados na tabela 5.3. Amostras padrão foram utilizadas para a validação dos resultados.

Tab. 5.3 – Resultado da determinação do tipo sexuado. LMM corresponde a Laboratório de Micologia Médica (Instituto de Pesquisa Clínica Hospital Evandro Chagas – Fiocruz). Mat corresponde a mating type

<b>LMM</b>	<b>Origem</b>	<b>Mat</b>
23	Clínica	alfa
201	Clínica	alfa
293	Clínica	alfa
330	Clínica	alfa
362	Clínica	alfa
414	Ambiental	alfa
447-12	Ambiental	alfa

---

484-3	Ambiental	alfa
484-2	Ambiental	alfa
484-1	Ambiental	alfa
498	Ambiental	alfa
562-11	Ambiental	alfa
562-10	Ambiental	alfa
562-9	Ambiental	alfa
561-7	Ambiental	alfa
562-8	Ambiental	alfa
562-7	Ambiental	alfa
561-1	Ambiental	alfa
655	Ambiental	alfa
724	Clínica	alfa
727	Ambiental	alfa
817	Clínica	alfa
818	Clínica	alfa
1030	Clínica	alfa
1035	Clínica	alfa
1167	Clínica	alfa
1168	Clínica	alfa
1169	Clínica	alfa
1170	Clínica	alfa
1171	Clínica	alfa

---

## 6 – DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo revelaram que tanto as cepas clínicas como as cepas isoladas do ambiente apresentaram resultado positivo no meio CGB. Foram utilizadas para esta técnica, três sementes do mesmo isolado, todos com resultados idênticos, indicando que os isolados são homogêneos quanto a este aspecto metabólico e que não há, em princípio mistura de espécies de *C. neoformans* e *C. gattii* nos isolados analisados.

As cepas provenientes do estado do Pará foram submetidas à revisão para esta técnica e duas apresentaram CGB negativo no Laboratório da FIOCRUZ, indicando *C. neoformans*. Originalmente em Belém, estes dois isolados foram consideradas CGB positivo, o que indicaria *C. gattii*. A possibilidade de teste falso positivo no teste em meio CGB é muito baixa, abaixo de 0.5%, se o procedimento atender as recomendações da metodologia (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992). As causas mais comuns de falso positivo são contaminantes, como bactérias, por exemplo, *Staphylococcus* e também fungos como *Candida sp* e *Aspergillus sp.*, que causam viragem do CGB, pois metabolizam seus componentes. Outro fator, bastante comum é o excesso de inóculo do isolado de *Cryptococcus* a ser testado no meio CGB, que carrega fontes endógenas de carbono e nitrogênio, levando a resultados falso-positivos.

Deve-se observar que as cepas discordantes eram de origem clínica, portanto a condição imunológica do paciente, o local de residência, bem como a idade, são determinantes para caracterizar a doença como oportunista ou primária.

O estudo de sorotipagem e determinação dos padrões regionais, publicado por Nishikawa et al. (2003) descreve que cepas do sorotipo B representam o agente mais freqüente de criptococose na região Nordeste do Brasil, ocorrendo igualmente em homens e mulheres, nativos da região, principalmente provenientes de áreas rurais, conferindo um caráter regional de aquisição da micose. Corrêa (2002), também descreveu 19 casos da doença, em crianças do estado do Pará, tendo isolado de todos os casos, cepas da espécie *gattii*.

A maioria das cepas clínicas utilizadas para este trabalho foi proveniente das regiões Norte (três do Amazonas e cinco do Pará) e Nordeste (duas da Bahia e uma do Piauí). Quatro cepas foram provenientes de pacientes do Rio de Janeiro, onde a micose, pela espécie *gattii* e em pacientes imunocompetentes não configura caráter endêmico.

Fortes e cols. (2001) isolaram e descreveram pela primeira vez a presença de *C. gattii* em ambiente de floresta tropical nativa, contrastando com estudos anteriores que descreviam o nicho do fungo relacionado à floração do eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*) (ELLIS & PFEIFFER, 1990). Lazéra e cols. (1998 e 2000) também descreveram possíveis novos nichos para o patógeno, nas regiões Nordeste e Sudeste do Brasil. Mais recentemente, Nishikawa (2003) afirmou que a inesperada freqüência de infecção por sorotipo B em hospedeiros HIV positivos (cerca de 10 a 12%) pode estar relacionado ao caráter endêmico do patógeno na região Nordeste do Brasil, de onde podem ser isoladas no mesmo ambiente, tanto cepas do sorotipo B, quanto do sorotipo A, indicando que a população pode estar exposta a ambos os sorotipos.

As cepas ambientais utilizadas neste trabalho foram integralmente caracterizadas dentro do sorotipo B. Este resultado está de acordo com os estudos recentes de Nishikawa (2003) que descreveu padrões de isolamento de sorotipos por região.

A caracterização do tipo sexuado foi realizada utilizando-se os iniciadores descritos por Chaturvedi (2000), para identificação do feromônio. Os resultados concordam com estudos moleculares que revelam a grande frequência de isolados *Mat α* em natureza (KWON-CHUNG & BENNETT, 1978; TSCHARKE et al., 2003).

## 7 – CONCLUSÃO

- Dos 30 isolados analisados e suspeitos de *C. gattii*, dois eram *C. neoformans*.
- O teste CGB apresentou resultado falso positivo nestes dois isolados possivelmente relacionados à metodologia utilizada no laboratório de origem.
- Houve correspondência dos resultados de CGB e de sorotipagem em todos os isolados testados.
- Não foram observados isolados mistos de *C. neoformans* e *C. gattii*.
- O perfil fenotípico de *C. gattii* nas cepas analisadas é de CGB positivo, sorotipo B e *Mat alfa*, tanto na região N como na região NE.

Os resultados deste estudo mostraram que a caracterização fenotípica dos isolados é parte necessária e fundamental para o desenvolvimento de estudos mais aprofundados dos aspectos moleculares do patógeno *C. gattii*, que ocorre em duas regiões climaticamente diferentes como o estado do Piauí, transição do semi-árido e floresta amazônica e Belém, já em plena área de floresta tropical úmida.

## 8 - COMENTÁRIOS

Novos primers podem ser utilizados para a averiguação e confirmação das características sexuadas, como cepas *mating type*  $\alpha/a$ , que caracterizam prováveis cepas híbridas, tanto para *C. neoformans*, como para *C. gattii*, uma vez que já há casos descritos de infecção simultânea por ambas as espécies de *Cryptococcus* (MARTINS et al., 2003; FORTES et al., 2003), bem como a comparação genotípica destas cepas, dentro dos padrões descritos (MEYER et al., 2003).

Estudos de ploidia também podem ser desenvolvidos a partir do conhecimento das características fenotípicas e sexuadas do fungo, para esclarecer aspectos da sua reprodução e comportamento no ambiente.

## REFERÊNCIAS DE LITERATURA

- Ajello L. 1958. Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in soil. Am. J. Hyg. 67: 72 – 77.
- Bastide JM, Mallie M., 1986. Ultrastructure et biologie de *Cryptococcus neoformans*. Le Biologist – Tomo XX, 166: 311 – 26.
- Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WCJ, Abeln ECA, Dromer F and Meyer W. 2001. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. Microbiology. 147: 891 – 907.
- Boekhout T, van Belkum A, Leenders ACAP, Verbrugh HA, Mukamurangwa P, Swinne D and Scheffers WA. 1997. Molecular Typing of *Cryptococcus neoformans*: taxonomic and epidemiological aspects. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 432 – 442.
- Casadevall A; Perfect JR. 1998. *Cryptococcus neoformans*. ASM Press. Washington, D.C.
- Cavalcanti MAS. 1997. Criptococose e seu agente etiológico no meio norte, Estados do Piauí e Maranhão, Tese de Doutorado – Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.
- Chatuverdi S, Rodeghier B, Fan J, McClelland CM, Wickes BL and Chatuverdi V. 2000. Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* MAT $\alpha$  and MAT $\alpha$  pheromones to determine mating type, ploidy and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies. J. Clin. Microbiol. 38: 2007 – 2009.
- Chatuverdi V, Fan J, Stein B, Behr MJ, Samsonoff WA, Wickes BL and Chatuverdi S. 2002. Molecular genetic analyses of mating pheromones reveal intervariety mating or hybridization in *Cryptococcus neoformans*. Infect. and Immun. 70 (9): 5225 – 5235.
- Cogliati M, Esposto MC, Clarke DK, Wickes BL and Viviani MA. 2001. Origin of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* Diploid Strains. J Clin Microbiol. 39: 3889 – 3894.
- Corrêa MPSC, Oliveira EC, Duarte RRBS, Parda PPO, Oliveira FM e Severo LC. 1999. Criptococose em crianças no Estado do Pará, Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 32: 505 – 508.
- Corrêa MPSC, Severo LC, Oliveira FM, Irion K, Londero AT. 2002. The spectrum of computerized tomography (CT) findings in central nervous system (CNS) infection due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in immunocompetent children. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo., 44: 283 – 287.
- Deacon JW. 1997. Genetics. P. 136 – 158. In: Modern Mycology 3 ed. Blackwell Science Ltd. Osney Mead, Oxford.
- Doering TL. 2000. How does *Cryptococcus* get its coat? Trends Microbiol 8:547 – 554

- Ellis D, Pfeiffer TJ. 1990. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. J. Clin. Microbiol. 28: 1642 – 1644.
- Fisher D, Burrow J, Lo D, Currie B., 1993. *Cryptococcus neoformans* in tropical northern Australia predominantly variant *gattii* with good outcomes. Aust., NZJ. Med. 23(6): 678 – 82.
- Fortes ST, Asato MS, Fortes AT, Lazera MS e Wanke B. 2003. Meningoencefalite criptocócica – caso inédito de infecção simultânea por ambas as variedades de *Cryptococcus neoformans*. Rev. Soc. Brás. Méd. Trop. 36(I): 231. Resumo 294P.
- Fortes ST, Lazera MS, Nishikawa MM, Macedo RCL, Wanke B. 2001. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. Mycoses 44: 137-140.
- Fraser JA, Subaran RL, Nichols CB and Heitman J. 2003. Recapitulation of the sexual cycle of the primary fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: implications for an outbreak on Vancouver Island, Canada
- Hoang LM, Maguire JA, Doyle P, Fyfe M, Roscoe DL. 2004. *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver Hospital a Health Sciences Centre (1997 – 2002): epidemiology, microbiology and histopathology. J. Med. Microbiol. 53 (9): 935 – 940.
- Hogan LH, Klein BS, Levitz SM. 1996. Virulence Factors of Medically Important Fungi. Clin Microbiol Rev. .9:469 – 488.
- Hull CM, Heitman J. 2002. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. Annu. Rev. Genet. 36:557 – 615.
- Keller SM, Viviani MA, Esposto MC, Cogliati M and Wickes BL. 2003. Molecular and genetic characterization of a serotype A *MATa* *Cryptococcus neoformans* isolate. Microbiology, 149: 131 – 142
- Kidd SE, Hagen F, Tscharke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, MacDougall L and Boekhout T. 2004. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). PNAS. 101(49): 17258 – 17263.
- Kwon-Chung KJ, Bennett JE and Rhodes JC, 1982. Taxonomic studies of *Filobasidiella* species and their anamorphs. Antonie van Leeuwenhoek. 48: 25 – 38.
- Kwon-Chung KJ, Bennett JE. 1978. Distribution of  $\alpha$  and a mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. Am. J. Epidemiol., 108: 337 – 340.
- Kwon-Chung KJ, Bennett JE. 1984. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. Am. J. Epidemiol., 120: 123-30.
- Kwon-Chung KJ, Bennett JE. 1992. Cryptococcosis. P. 397 – 446 In: Medical Mycology., Lea & Febiger, Philadelphia, Pa.

- Kwon-Chung KJ, Boekhout T, Fell JW and Diaz M. 2002. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon* 51:804 – 806.
- Kwon-Chung KJ, Pfeiffer T, Chang YC, Wickes BL, Mitchell D and Stern JJ. 1994. Molecular biology of *Cryptococcus neoformans* and therapy of cryptococcosis. *J Med Vet Mycol.*; 32 (1): 407 – 415.
- Kwon-Chung KJ, Polacheck I and Bennett JE. 1982. 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.* 15: 535 – 537.
- Kwon-Chung KJ, Varma AK and Howard DH. 1988. Ecology and epidemiology of *Cryptococcus neoformans*: a recent study of isolates in the United States. In Proceedings X Congress ISHAM, June 27 – July 1, pp. 107 – 112. Edited by J. M. Torres-Rodríguez. Barcelona: Prous Science.
- Kwon-Chung KJ. 1975. A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia*, 67: 1197 – 1200.
- Kwon-Chung KJ. 1976. Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia*. 68: 821 – 823.
- Lazera MS, Cavalcanti MAS, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM and Wanke B. 2000. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Med. Mycol.* 38:379-383.
- Lazera MS, Pires FDA, Camilo-Coura L, Nishikawa MM, Bezerra CCF, Trilles L, and Wanke B. 1996. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. *J. Med. Vet. Mycol.* 34:127-131.
- Lazera MS. 1989. Fontes saprofíticas de *Cryptococcus neoformans* na cidade do Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado – Mestrado em Medicina Tropical – Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Lengeler KB, Cox GM, Heitman J. 2001. Serotype AD Strains of *Cryptococcus neoformans* are Diploid or Aneuploid and are heterozygous at the Mating-Type Locus. *Infect and Immun.*, 69: 115 – 122.
- Lengeler KB, Fox DS, Fraser A, Allen A, Forrester K, Dietrich FS and Heitman J. 2002. Mating-Type Locus of *Cryptococcus neoformans*: a step in the evolution of sex chromosomes. *Eukaryotic Cell*, 1: 704 – 718.
- Machado CC, Amaral AA e Severo LC. 1993. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* isolado do solo. *Rev. Inst. Med. Trop. S.Paulo*, 35: 77 – 79.
- Martins LMS, Lazera MS, Leal MJS, Cavalcanti MAS, Eulálio KD e Wanke B. 2003. Infecção mista por sorotipo A e B de *Cryptococcus neoformans* como causa de meningoencefalite em criança de Itaituba – PA: relato de caso. *Rev. Brás. Méd. Trop.* 36 (1): 216. Resumo 263P.

- Martins LMS. 2003. Epidemiologia da criptococose em crianças e diversidade de *C. neoformans* no Meio-Norte do Brasil. Dissertação de Mestrado – Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.
- Melo NT, Nigro RC, Pereira AD. 1987. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de fezes de pombos, do solo e ninhos de pombos. R. Brás. Méd. 44: 19 – 23.
- Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E and the IberoAmerican Cryptococcal Study Group. 2003. Molecular Typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. Emerg. Infect. Dis. 9 (2): 189 – 195.
- Meyer W, Marszewska K, Amirmostofian M, Igreja RP, Hardtke C, Methling K, Viviani MA, Chindamporn A, Sukroongreung S, John MA, Ellis DH and Sorrell TC. 1999. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA—a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. Electrophoresis. 20 (8): 1790 – 1799.
- Mitchell TG, Perfect JR 1995. Cryptococcosis in the Era of AIDS – 100 Years after the Discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clin Microbiol Rev. 8 (4): 515 – 548.
- Nielsen K, Cox GM, Wang P, Toffaletti DL, Perfect JR and Heitman J. 2003. Sexual Cycle of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and Virulence of Congenic  $\alpha$  and  $\alpha$  Isolates. Infect and Immun. 71:4831 – 4841.
- Nishikawa MM, Lazéra MS, Barbosa GG, Trilles L, Balassiano BR, Macedo RCL, Bezerra CCF, Pérez MA, Cardarelli P and Wanke B. 2003. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* Isolates from Clinical and Environmental Sources in Brazil: Analysis of Host and Regional Patterns. J Clin Microbiol., 41:73 – 77.
- Ohkusu M, Tangonan N, Takeo K, Kishida E, Ohkubo M, Aoki S, Nakamura K, Fujii T, Siqueira IC, Maciel EAP, Sakabe S, Almeida GMD, Heins-Vaccari EM and Lacaz CS. 2002. Serotype, Mating Type And Ploidy of *Cryptococcus neoformans* Strains Isolates From Patients In Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 44:299 – 302.
- Perfect JR and Casadevall A. 2002. Cryptococcosis. Infect. Dis. Clin. N. Am. 16: 837 – 874.
- Rogers AL, Beneker ES. 1964. Human pathogenic fungi recovered from brazilian soil. Mycopathologia. 22: 15 – 20.
- Rozebaum R, Gonçalves AJR. 1994. Clinical epidemiological study of 171 cases of cryptococcosis. Clin.Infect. Dis. 18:369-380.
- Severo LC, Oliveira EC, Silva ABM and Pardal PPO. 1986. Clinical manifestation of 26 cases of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. Third International Conference on *Cryptococcus neoformans* and cryptococcosis. In: Abstract of Institut Pasteur, Paris, p. 182.
- Shimizu RY, Howard DH and Clancy MN. 1986. The variety of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. J. Infect. Dis. 154: 1042.

- Silva ME. 1960. Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* e *Mycrosporium gypseum* em solos da Bahia. B. Fund. G. Muniz. 17: 1 – 14.
- Steenbergen JN, Casadevall A. 2003. The origin and maintenance for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. Mic. And Infect 5: 667 – 675.
- Swinne-Desgain D. 1975. *Cryptococcus neoformans* of saprophytic origin. Sabouraudia 13: 303 – 308.
- Takeo K, Tanaka R, Taguchi H and Nishimura K. 1993. Analysis of ploidy and sexual characteristics of natural isolates of *Cryptococcus neoformans*. Can. J. Microbiol., 39: 958 – 963.
- Tanaka R, Taguchi H, Takeo K Miyaji M and Nishimura K. 1996. Determination of ploidy in *Cryptococcus neoformans* by flow cytometry. J. Med. Vet. Mycol., 34: 299 – 301.
- Trilles L, Lazera M, Wanke B, Theelen B and Boekhout T. 2003. Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. Med Mycol. 41(5): 383 – 90.
- Tscharke RL, Lazera MS, Chang YC, Wickes BL and Kwon-Chung KJ. 2003. Haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans* is not mating type  $\alpha$ -specific. Fung Gen. and Biol., 39: 230 – 237.
- Wickes BL, Moore TDE and Kwon-Chung KJ. 1994. Comparison of the electrophoretic karyotypes and chromosomal location of ten genes in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. Microbiology. 140: 543 – 550.
- Yan Z, Li X and Xu J. 2002. Geographic distribution of mating type alleles of *C. neoformans* in four areas of the United States. J. Clin Microbiol. 40:965 – 972.